

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号  
特表2001-524825  
(P2001-524825A)

(43)公表日 平成13年12月4日(2001.12.4)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 6 1 K 39/106	
A 6 1 K 39/106		A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 1/04		C 0 7 K 14/025	
C 0 7 K 14/025		C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15		1/19	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 106 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平10-544598	(71)出願人	ハー マジェスティ イン ライト オブ カナダ, アズ リプレゼンティッド バ イ ザ ミニスター オブ ヘルス アン ド ウェルフェア, カナダ
(86) (22)出願日	平成10年3月25日(1998.3.25)		
(85)翻訳文提出日	平成11年9月27日(1999.9.27)		
(86)国際出願番号	P C T / C A 9 8 / 0 0 2 7 2		
(87)国際公開番号	W O 9 8 / 4 2 8 4 2		
(87)国際公開日	平成10年10月1日(1998.10.1)		
(31)優先権主張番号	6 0 / 0 4 1 , 2 0 0	(72)発明者	ジョンソン, ウェンディー エム. カナダ国, オンタリオ ケー1アール 5 ケー9, オタワ, マクラーレン ストリー ト 1-590
(32)優先日	平成9年3月25日(1997.3.25)		
(33)優先権主張国	米国 (U S)	(74)代理人	弁理士 石田 敬 (外4名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 カンピロバクター・ジェジュニ由来のポーリン遺伝子、その関連生成物及び使用

#### (57)【要約】

本発明は、Campylobacter jejuni由来のポーリン遺伝子[配列番号：3]に関する。この遺伝子は、porAと称され、長さが1275bpであり、45.6kDaでpIが4.44であるタンパク質[配列番号：2]を発現する。この遺伝子の配列決定及びクローニングは、様々な医学的及び工業的利用を可能にする。例えば、DNAコードの知識は、試験する検体中の遺伝子を同定するためのDNAプローブをデザインすることを可能にする。陽性の結果は、検体中のこの遺伝子の存在を示し、かつC. jejuniの存在の強力な指標である。このようなプローブは、更に対応するcDNAを単離するためにも使用することができ、その後これは、ポリメラーゼ連鎖反応により増幅される。公知の配列を基にしたDNAプローブの開発は、当業者には良く知られている公知の方法であり、かつこのような当業者には過度の実験を行うことなく適当なプローブを開発することが可能であろう。通常、このようなプローブは、該cDNA配列由来の少なくとも15個の連続するヌクレオチドからなる。

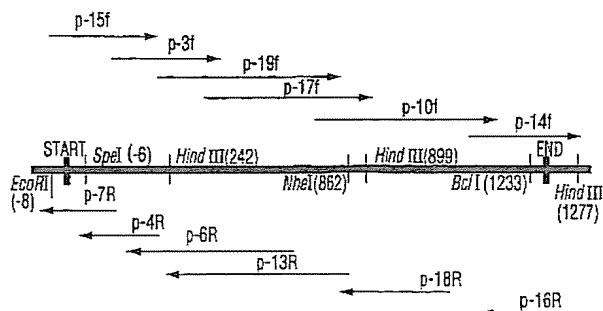


FIG. 1

## 【特許請求の範囲】

1. カンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*) の porA タンパク質、又はそれらの抗原性断片をコードすることを特徴とする、単離されかつ精製された核酸。
2. 前記核酸が、計算された分子量 45.6kDa 及び pI の 4.44 を有する、424 個のアミノ酸の細胞傷害性タンパク質をコードすることを特徴とする、請求項 1 記載の核酸。
3. *Campylobacter jejuni* の 2483 株 (ATCC 受託番号) に由来することを特徴とする、請求項 1 記載の核酸。
4. 配列番号：2 のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸であり、ここでアミノ酸配列が、該タンパク質の細胞傷害性の特徴を変更しないようなアミノ酸の置換、付加及び欠失を包含していることを特徴とする、請求項 1 記載の核酸。
5. 前記核酸が配列番号：3 であり、ここでヌクレオチド配列が、コードされたタンパク質の細胞傷害性の特徴を変更しないようなヌクレオチドの置換、付加及び欠失を包含していることを特徴とする、請求項 1 記載の核酸。
6. 請求項 1、請求項 2、請求項 3、請求項 4 及び請求項 5 記載の核酸の少なくとも一部によってコードされた、精製された細胞傷害性タンパク質。
7. 配列番号：2 のアミノ酸配列によって特徴付けられる、請求項 6 記載の精製されたタンパク質。
8. プローブが、標的配列である配列番号：1 の一部に相当するヌクレオチド配列を有し、ここで該プローブのヌクレオチド配列は、該標的に特異的に結合するプローブの能力に影響することのないような、ヌクレオチドの置換、付加及び欠失を包含していることを特徴とする、DNA プローブ。
9. *Campylobacter jejuni* 感染の存在の検出法であって：

a) 感染が疑われる患者から得た検体を、請求項 6 又は請求項 7 記載の検出可能な量のタンパク質に、該タンパク質及び該検体中に存在するいずれかの抗-*Campylobacter*

acter *jejuni* 抗体が複合体を形成するのに十分な時間接触する工程；及び  
b) 工程 (a) において形成された複合体の存在、及び任意にその量を検出する工程を特徴とする方法。

10. *Campylobacter jejuni* を有すると疑われる検体を患者から採取し、かつ請求項 1、請求項 2、請求項 3、請求項 4 又は請求項 5 記載の特徴的核酸が該検体中に含まれているかどうかを検出することを特徴とする、患者の *Campylobacter jejuni* の存在の検出法。
11. 前記核酸が、該検体中に存在する該特徴的核酸のいずれかの増幅により検出され、かつその後増幅された核酸が検出される、請求項 10 記載の方法。
12. 前記増幅が、ポリメラーゼ連鎖反応によって達成される、請求項 11 記載の方法。
13. 請求項 6 又は請求項 7 記載の抗原性タンパク質、又はそれらの抗原性断片、並びに医薬として許容できる希釈剤又は担体を含む、医薬組成物。
14. *Campylobacter jejuni* の porA タンパク質、又はその抗原性断片をコードする領域によって特徴付けられる、単離された発現ベクター。
15. 前記領域が配列番号：3 をコードすることを特徴とする、請求項 14 記載のベクター。
16. 請求項 14 又は請求項 15 記載の発現ベクターで形質転換又はトランスフェクションされた宿主。
17. 前記検体のための容器、該ポリペプチドを収容する入れ物、及び該複合体を検出する手段を含む、請求項 9 記載の方法を実践するためのキット。
18. 前記抗体を保持する入れ物のための容器、及び該複合体を検出する手段を含む、請求項 10 記載の方法を実践するためのキット。
19. *Campylobacter jejuni* の porA 抗原又はそれらの抗原性断片を免疫原として有効量、並びに医薬として許容できる担体を含むワクチン。
20. 配列番号：2 のアミノ酸配列を有するタンパク質を含み、ここでアミノ酸配列が、ヒト又は動物の体内に導入された際に、タンパク質の抗体産生能力を変えないようなアミノ酸の置換、付加及び欠失を包含していることを特徴とする

、ワクチン。

21. ヒト又は動物宿主に外来タンパク質を投与することにより、宿主において免疫応答を誘導する方法であって、該タンパク質が、配列番号：2のアミノ酸配列を有し、ここでアミノ酸配列が、ヒト又は動物の体内に導入された際に、タンパク質の抗体産生能力を変更しないようなアミノ酸の置換、付加及び欠失を包含していることを特徴とする方法。

22. *Campylobacter jejuni*による感染を試験するための抗体を製造する方法で、配列番号：2のアミノ酸配列を有するタンパク質が、ヒト又は動物の体内に導入され、抗体を産生し、かつこの抗体が、引き置き散生体から単離され、ここで該アミノ酸配列が、ヒト又は動物の体内に導入された際に、タンパク質の抗体産生能力を変更しないようなアミノ酸の置換、付加及び欠失を包含していることを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

カンピロバクター・ジェジュニ由来のポリーリン遺伝子、その関連生成物及び使用技術分野

本発明は、カンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*) 由来のポリーリン遺伝子、関連生成物及びその使用に関する。

背景技術

以下の考察において、括弧内の数字は、本明細書の最後に示された“参考文献”の項に指定された論文を意味するものである。

*Campylobacter jejuni*は、開発途上国及び低開発国の両方における、細菌誘発性下痢の原因菌として認められている (39, 41)。米国において実施された活動性調査は、カンピロバクター症の症例数を年間250万人と推定し、これを数百万ドル疾患とした(39)。C. *jejuni*によって引き起こされた症状は、水性下痢から血液性下痢に及ぶ(28, 39)。ほとんどの症例において、カンピロバクター症は、自己限定性の疾患であるが、より重篤な症例においては、感染を根絶するためにマクロライド系又はフルオロキノロン系の抗生物質の介入、もしくは再水和療法が必要である(28)。

この生物は、病因となるいくつかの毒性因子を有することが報告(11,26,40)されているが、それらの生成を取り巻く遺伝子的過程についてはほとんどわかっていない。ひとつの毒性因子である毒素は、クローン化されかつうまく配列決定され、これはC. *jejuni*の細胞致死性膨張性毒素(CLDT)である(34)。このCLDTオペロンは、*cdtA*、*cdtB*及び*cdtC*と称され、各々、30.1kDa、28.9kDa及び21.1kDa

タンパク質に相当する、3種の読み枠(ORF)を含むことが分かった(34)。大腸菌ミニ細胞を用いた実験は、全ての3遺伝子が、活性毒素の産生に必要であることを示した。*cdtB*遺伝子の存在に関するポリメラーゼ連鎖反応(PCR)及びCLDTの発現に関するHeLa細胞アッセイによるカンピロバクター種の複数の菌株のスクリーニングは、試験した全ての菌株が、この遺伝子を有し、かつ細胞培養アッセイにおいて陽性と判定されたことを明らかにした(34)。Johnson及びLior(19)は、当初、CLDT産生に関してスクリーニングしたカンピロバクター種の718菌株体の42%が

陽性であるが；*cdtB*遺伝子についてスクリーニングした単離体は、この割合が先に報告された値(19, 34)よりも高いことを示したと報告した。C. jejuniによるエンテロトキシンの産生に関する遺伝子研究は、*Vibrio cholerae*由来の*toxB*遺伝子上の仮定されたOM結合部位及び*E. coli*由来の*eitE*遺伝子の間に、DNAの類似性があることを明らかにした。それにもかかわらず、エンテロトキシ遺伝子は、C. jejuniから首尾尾尾くクローン化も配列決定もされていない(5)。

C. jejuniは、バルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)によりサイズが1.7Mbと推定されるゲノムを有する(43)一方で、グアニジン+シトシンの割合は、29~36%の範囲である(42, 43)。この生物は、遊離のDNAを形質転換する能力に加え、バクテリオファージにより形質導入され、かつ接合により菌株間のDNAを転移する能力を有する(42, 44)。これらの遺伝子交換のメカニズムは、菌株間に抗生物質耐性決定基の伝播を促進し(44)、かつ1個の菌株により、他の[*lanther*]菌株の毒素産生獲得を生じることがある(32)。多くの遺伝子が、C. jejuniから配列決定されている(42)；しかしこれらの大部分は、高度に保存された形、又はセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ(*glyA*) (7)及び(γ-グルタミルリン酸レダクターゼ遺

伝子(*proA*) (22)のような“ハウスキーパー”遺伝子の形をとる。これに加えて、鞭毛タンパク質をコードしている*flaA*及び*flaB*のような遺伝子(15)並びに*peb4* A、抗原性表面タンパク質(4)が、クローン化されかつ配列決定されている。遺伝子の不安定性のような困難さ及び機能性生成物の発現の不良に直面し、かつこれはC. jejuniの遺伝子解析を問題の多いものになっている(34, 42)。

様々な細菌種からいくつものポリーリン遺伝子が精製され、クローン化され、かつ配列決定されている(6, 14, 16, 17, 27)。これらのポリーリンは、通常単一のモノマータンパク質(16, 29)又はホモ三量体(3, 6)として存在し、かつ全てが、それらの相対的細孔の大きさにおいて変動を示している(3, 17)。ポリーリンは、細菌の外膜の機能的成分であり、かつこれらは溶質の交換を可能にし、更に生じた廃棄物の排泄をもたらす。*E. coli*由来のポリーリンと特徴づけられたものは、各細菌細胞上に10<sup>7</sup>の頻度で出現することがわかっていて(27, 46)、細胞表面にお

いて最も豊富な分子の存在をもたらす(36, 46)。ポリーリンは更に、インキュベーション後の細胞骨格における変化の結果として、HEp-2細胞において形態学的変化を誘発し、精製されたタンパク質の濃度の上昇をもたらすことが分かっている(8)。

C. jejuniの主要外膜タンパク質(MOMP)は、最初に単離され、かつ脂質二重層膜に再構築され、かつポリーリンのものと一致する小さいチャネルを形成することがわかった(18)。MOMPは、未変性状態で見かけの分子量45kDaを有し、かつ機能的なポリーリンを形成するには3倍の単量体が必要であるので、これが三量体ポリーリンファミリーの一員であることが確認された(3)。そのN-末端配列が解明され、かつ他の細菌ポリーリンタンパク質との相溶性はほとんど含まない(3)が、*W. re* *cta*由来の2個の外膜タンパク質とは相溶性を共有

する(20)ことが発見されている。この論文において、C. jejuni由来のポリーリン-LPS複合体は、熱に不安定な細胞傷害性活性を有し、かつHEp-2細胞においてはアポトーシスを誘導することが可能であるが、Vero細胞においては不可能であることが報告されている。

従って、その細孔の能力に関して該タンパク質の特徴は既に報告されているが(18)、対応する遺伝子及びその配列は、これまでに確立されていない。

#### 発明の説明

本発明の目的は、細胞傷害性タンパク質-LPS複合体の産生に寄与するC. jejuniのポリーリン遺伝子を同定しかつ配列決定するために、遺伝子をクローン化しかつ発現し、その結果有用な生成物及び方法を開発することができ

る。別の本発明の目的は、C. jejuniによる哺乳類の感染症の確定及び治療を促進するため、並びにこのような感染症を予防するために、該生物の細胞傷害性活性に寄与する遺伝子を同定することである。

本発明のひとつの態様において、*Campylobacter jejuni*から単離されかつ精製された*porA*遺伝子で、算出された分子量45.6kDa及びpIが4.44である、424個のアミノ酸の細胞傷害性タンパク質を発現することを特徴とする遺伝子が提供される。

別の本発明の態様は、DNAプロローブが、標的配列である配列番号：1の一部に相当するヌクレオチド配列を有し、ここでプロローブのヌクレオチド配列が、該標的に特異的に結合するプロローブの能力に影響を及ぼさないようなヌクレオチド配列の置換、付加及び欠失を包含していることを特徴とする、DNAプロローブを含む。

本発明は更に、以下の工程を特徴とする、Campylobacter jejuni

感染の存在の検出法に関する：a) 感染が疑わしい患者から得た検体を、本発明の核酸の少なくとも一部によってコードされた検出可能な量の精製された細胞傷害性タンパク質[rotein]に、該タンパク質及び該検体中に存在するいずれかの抗-Campylobacter jejuni抗体の間に複合体を形成するのに十分な時間、接触する工程；及び、b)工程(a)において形成された複合体の存在、及び任意に量を検出する工程。

別の形において、本発明は、Campylobacter jejuniのporAタンパク質、又はそれらの抗原性断片のコード領域によって特徴付けられる、単離された発現ベクターを含む。

本発明に含まれるのは、外来タンパク質を宿主に投与することによる、ヒト又は動物宿主における免疫応答の誘導法であり、このタンパク質は、配列番号：2のアミノ酸配列を有し、ここでアミノ酸配列は、抗体がヒト又は動物の体内に導入される場合にこれを生じるタンパク質の能力を変更しないアミノ酸の置換、付加及び欠失を包含していることを特徴としている。

本発明の更なる態様は、Campylobacter jejuniによる感染を試験するための抗体を産生する方法であり、これは、配列番号：2のアミノ酸配列を有するタンパク質が、ヒト又は動物の体内に導入され、抗体を生じ、それに続きこの抗体が体内から単離され、ここで該アミノ酸配列は、抗体がヒト又は動物の体内に導入される場合にこれを生じるタンパク質の能力を変更しないアミノ酸の置換、付加及び欠失を包含していることを特徴としている。

図面の簡単な説明

図1は、C. jejuni菌株2483由来のporAの配列決定反応及び制限地図の概略図であり、ベクターライブラリー (vectorette library)

の作成において使用された酵素の制限部位を示す(矢印は、無傷の遺伝子の配列決定において使用した方向及びプライマーを示す。)；

図2は、ジゴキシゲンニンで標識した650bpプロローブを用いるゲノム消化のサザンブロット分析を示す。レーン1及び10：Hind IIIで消化したラムダDNA；レーン2：Hind IIIで消化したC. jejuniゲノムDNA；レーン3：BamHIで消化したC. jejuniゲノムDNA；レーン4：BgI Iで消化したC. jejuniゲノムDNA；レーン5：Nhe Iで消化したC. jejuniゲノムDNA；レーン6：EcoRIで消化したC. jejuniゲノムDNA；レーン7：Bcl Iで消化したC. jejuniゲノムDNA；レーン8：Spe Iで消化したC. jejuniゲノムDNA；レーン9：E. coli Xba Iで消化したゲノムDNA。

図3は、porA遺伝子の完全な読み枠及び翻訳されたタンパク質を示す。1本線の配列は、予想されるシヤイン・ダルガルノのリボソーム結合部位(RBS)、-10及び-35配列を示し、かつ2本線は、DNA5bpループ、それに続くポリT領域を伴うp-非依存の転写終結点を示すステムループ構造を示す。太字は開始コドンを示し、かつ“\*”は停止コドンを示し、数字は、スクレオチド及びアミノ酸の番号である。

図4は、GCG (Genetics Computer Group社)を用いて、C. jejuni PorAを、H. influenzae P2、E. cloacae PhoE、K. pneumoniae PhoE、S. typhi OmpC、及びE. coli PhoEと並置している。大文字は、同じ又は保存された変化を示し、小文字は配列の不一致を示し、空白(…)は、最良の並置を達成するために挿入した。“\*”は、停止コドンを示す。

図5は、porA遺伝子の末端配列のステムループ構造を示す。数字は、図3の1450bp断片中のループにおける位置を示す。

図6Aは、対照細胞としてのC. jejuni細胞傷害性ポリーリン-LPS複合体によって48時間処理した後の、HEp-2細胞内に誘導された形態学的変化を示す；

図6Bは、単離されたC. jejuni細胞傷害性複合体1 $\mu$ gで中毒化した細胞の形態学的変化を示す；細胞質液に注目(矢印)；

図6Cは、単離されたC. jejuni細胞傷害性ポリーリン-LPS複合体10 $\mu$ gで、中毒

化した細胞の形態学的変化を示す(倍率×150)；

溶離プロファイル及び銀染色を示す；

図7Bは、TSK DEAE-5PWカラムからのピークA分画の細胞傷害性複合体についての溶離プロファイル及び銀染色を示す。++は、48時間までに丸まったHep-2細胞が70%以上；++は、48時間までに丸まった細胞が50～70%；+は、48時間までに丸まった細胞が50%未満である；

図8は、40 $\mu$ gの粗、濃縮濾過し均質なウサギの抗血清を用いる、Campylobacter種から単離された細胞傷害性ポリーリン-LPS複合体のウェスタンブロット分析を示す。レーン1及び9；予備染色した標準物質(kDa)(Gibco BRL社)；レーン2；未接種のプロセス；レーン3；Aeromonas veronii CDC A2297 (陰性対照として使用)；レーン4；C. coli株8682；レーン5；C. jejuni CDC 16336；レーン6；C. jejuni CDC 3969；レーン7；C. jejuni株2483；レーン8；E. coli (VT) CDC C 3787；

図9は、未変性-PAGE(レーン1及び2)並びにSDS-PAGE(レーン3及び4)ゲルの、過ヨウ素酸シッフ(PAS)試薬及びクマシーブルーによる二重染色を示す。レーン1；未変性の低分子重量標準物質(Pharmacia社)；レーン2；C. jejuniの単離された細胞傷害性ポリーリン-LPS複合体と同時精製された未変性炭水化物10 $\mu$ g；レーン

3；C. jejuniの単離された細胞傷害性ポリーリン-LPS複合体と同時精製された熱変性された炭水化物10 $\mu$ g；レーン4；kaleidoscope予備染色した標準(kDa) (BioRad社)；

図10は、単離された細胞傷害性複合体のレクチンGNAによるウェスタンブロット分析を示す。レーン1及び4；kaleidoscope予備染色した標準物質(kDa) (BioRad社)；レーン2；単離されたC. jejuniの細胞傷害性ポリーリン-LPS複合体からの炭水化物10 $\mu$ g；レーン3；カルボキシペンタデゲーズ $\gamma$  15 $\mu$ g；

図11Aは、C. jejuni株2483 PorAに関する、PC/Geneソフトウェアパッケージを用いNovotnyの方法によって決定した、疎水性プロファイル及び $\beta$ シートの傾向

を示す；

図11Bは、H. influenzae P2に関する、疎水性プロファイル及び $\beta$ シートの傾向を示す；及び

図11Cは、C. jejuni FlaAに関する、疎水性プロファイル及び $\beta$ シートの傾向を示す。

発明を実施するための最良の態様

本発明は、内毒素であり、かつCampylobacter jejuni株間で非常に良好に保存されているが、他のカンピロバクター種においては広範に見つかっていないような、Campylobacter jejuniからのポリーリン多糖(LPS)複合体を同定することに基づいている。この複合体は単離され、かつ"porA"と称される対応するポリーリン遺伝子が、本発明者により、同定され、単離され、配列決定され、かつクローニングされている。

詳細に述べると、この複合体は、C. jejuni株2483から得られた。この菌株は天然には一般的なものであり、かつ本明細書において明らかにされた配列から適当なプローブを設計することによって同

定することができるが、本出願の発明者及び譲受人は、菌株の標本をアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852 USA) に寄託した。この寄託は、ブダペスト条約の条項に基づき、1998年に行なわれ、かつ受託番号が授与されている。

この遺伝子の配列決定及びクローニングは、様々な医学的及び工業的用途を可能にした。例えば、DNAコードに関する知識は、被験検体中の該遺伝子を同定するためのDNAプローブの設計を可能にした。陽性の結果は、検体中に該遺伝子が存在することを示し、かつC. jejuniの存在の強力な指標である。このようなプローブは、更に、対応するcDNAの単離に使用することができる。その後これはポリメラーゼ連鎖反応により増幅することができる。公知の配列を元にしたDNAプローブの開発は、当業者には良く知られている公知の方法であり、かつ当業者には過度な実験を行うことなく適当なプローブを開発することが可能であろう。通常、このようなプローブは、cDNA配列の少なくとも15個の連続するヌクレオチドか

らなる。

更に適当に形質転換された宿主（例えば形質転換されたE. coliなど）における、該遺伝子、又はその重要な部分の発現は、抗体を産生する免疫系を誘導する有用な量発現されたタンパク質の生成を可能にする。このことは、有害な作用を伴わずに、C. jejuniによる中酸化作用に対する、ワクチンを宿主に注射するために使用することができる。この目的のためには、このタンパク質は、適当な医薬として許容できる担体と共に使用することができ、かつ望ましい保護作用を達成する組成物中の該タンパク質の濃度で使用することができる。投与の適当な態様、例えば経口又は非経口投与を使用することができる。

このタンパク質は、更に、C. jejuniに感染した患者の血液検体

を検査する際に有用な抗体（例えばウサギにおいて）を製造するために使用することができる。

当業者には、本明細書において確定されたporA遺伝子の配列は、前述の本発明の用途に影響を及ぼすことなく、ヌクレオチドの一定数に置換、付加又は欠失による修飾を施すことができることが理解されるであろう。従って本発明は、更にこのような置換、付加又は欠失を示す単離されかつ精製された核酸、それらの発現生成物、及びこれらを同定するためにデザインされたプローブまで拡大される。

国際特許公開公報第WO 95/05850号(1995年3月2日に公開；発明者：Martin J B Taser；出願人：Enteric Research Laboratories, Inc)も同じく、porA遺伝子の単離及び使用、並びにそれらに由来する生成物を開示している。以下の情報及び方法は、詳細に言及するものである。

“単離された”核酸は、自然に生息する生物において見つかった他の核酸から分離されている。この特異的核酸は、ポリメラゼ連鎖反応、リガーゼ連鎖反応及びハイブリダイゼーションのような方法において、porA抗原を有するC. jejuniを検出するために使用することができる。

この単離された配列又はそれらの適当な断片は、該配列を適当なベクターにスプライシングし、かつ適当な宿主にトランスフェクションすることによって、po

rAタンパク質を生成するために利用することができる。これに加えて、この核酸は、他の細菌に存在するヌクレオチド配列と相同であることができる。他の細菌と共有されたこのようなアミノ酸配列は、例えば、同時に関連菌株を抽出するため、又は多保護(multiprotective)ワクチンの主成分として使用することができる。

porA抗原又はそれらの断片をコードしている核酸を、選択的にハイブリダイゼーションするか、もしくは選択的に増幅することが可能な単離された核酸も意図されている。前述の核酸に相補的な単離された核酸も提供されている。これらの配列は、該ヌクレオチド配列及び特定の配列の有用性を基に選択することができる。

前記核酸によってコードされたポリペプチドの本質的構造及び機能が維持されている限りは、本発明の核酸の修飾も意図されている。同様に、プライマー又はプローブとして使用される断片は、選択的ハイブリダイゼーションのために十分な相補的塩基が存在する限りは、置換を有することができる。

本発明の核酸によってコードされた精製された抗原性ポリペプチド断片も意図されている。“精製された”抗原は、汚染菌又は成分からの抗原を区別するため、通常抗原が現れるような汚染菌又は細胞成分が十分に含まれない。

この抗原の抗原性断片は、化学的又は機械的破壊により、抗原全体から単離することができる。こうして得られた精製された断片は、本明細書に記した方法により、それらの抗原性及び特異性を決定するために試験することができる。この抗原の抗原性断片は、直接合成することもできる。ある免疫反応性断片は、PorA抗原由来の少なくとも約[abut]5個の連続するアミノ酸の配列である。

本発明のポリペプチド断片は、抗原性ポリペプチド又はそれらの断片を産生することが可能な発現システムにおける、ポリペプチドをコードしている核酸のクローニングによって得られた組換えタンパク質であることもできる。

一旦抗原のアミノ酸配列が提供されたならば、該抗原の免疫反応性領域と相同であるように選択されたペプチド断片を、標準的ペプチド合成法を用いて合成すること、及び誘導された配列中の特定の

アミノ酸残基の封入(inclusion)、欠失又は修飾により変化することも可能である。従って、該抗原に由来する極めて多数のペプチドの合成又は精製が可能である。

本発明のポリペプチドのアミノ酸配列は、溶解度のような、いくつかの追加の特性を提供するためにデザインされた配列に付着したPorA抗原の免疫反応性部分を含むことができる。PorA抗原のアミノ酸配列は、1個以上のアミノ酸が別のアミノ酸で置換され、例えばジスルフィド結合が可能なアミノ酸の除去/付加、その生体寿命(bio longevity)の延長、酵素活性の変更、胃酸性との相互作用の変更などのようないくつかの追加の特性を提供する配列を含むことができる。とにかく、ペプチドは、免疫反応性、免疫原性のような生物活性の特性を有さなければならない。

#### 免疫原性の決定

こうして得られた精製されたポリペプチド断片は、それらの免疫原性及び特異性を決定するために、当該技術分野において公知の方法により試験することができる。様々な濃度の予想される免疫原性のある特異的断片を調製し、かつ動物に投与し、各濃度に対する動物の免疫応答(例えば、抗体産生又は細胞性免疫)を調べた。投与された抗原量は、例えばヒト又はマウスのような対象、対象の状態、対象の大きさなどによって決まる。その後該抗原がそのように接種された動物は、この特異的免疫原性のワクチン作用の可能性を試験するために、該動物に曝露する。この予想される免疫原性断片の特異性は、接種された動物から採取した血液又はリンパ球を他の密に関連した細菌との交差反応性について試験することによって、確かめることができる。

#### ペクター及び宿主

本発明の核殻を含むペクターも提供される。本発明のペクターは、宿主において、該抗原を発現することが可能である。抗原の発現に有用な、当業者には公知のE. coli発現ペクターが多くある。他の使用に適した細菌宿主は、Bacillus subtilisのようなバシラス属、及び他の腸内細菌、例えばサルモネラ、セラチア、及び様々なシュードモナス種を含む。

これらの原核宿主において、あるものは、発現ペクターを形成することができるものもあり、これは典型的には、宿主細胞と共存できる発現調節配列(例えば複製起点)を含む。これに加えて、例えばラクトースプロモーターシステム、トリプトファン(Trp)プロモーターシステム、 $\beta$ -ラクタマゼプロモーターシステム、又は $\lambda$ ファージ由来のプロモーターシステムのようないくつかの様々な周知のプロモーターが存在するであろう。これらのプロモーターは、任意にオペレーター配列と共に、典型的には発現を調節し、かつ例えば、転写及び翻訳の開始及び完了のためのリボソーム結合部位配列を有する。必要であるならば、アミノ末端メチオニンを、Metコード5'の挿入及び抗原とのフレーム内(in-frame)とすることにより提供することができる。更に、この抗原のカルボキシ末端の伸長は、標準的オリゴヌクレオチド突然変異誘発法を用いて除去することができる。加えて、酵母の発現を使用することができる。酵母の発現システムにはいくつかの利点がある。第一に、酵母分泌システムにおいて産生されたタンパク質は、正確なジスルフィド対を示すという証拠がある。第二に、翻訳後のグリコシ化が、酵母の分泌システムにより効果的に実施される。Saccharomyces cerevisiaeのプレープロー $\alpha$ 因子のリーダー領域(MF $\alpha$ -1遺伝子によってコードされる)は、酵母からのタンパク質の分泌を検出するために日常的に使用されている(Brakeら、1984)。このプレープロー $\alpha$ 因子のリーダー領域は、シグナルペプチド、及びKEX2遺伝子によってコードされた酵母プロテアーゼの認識配列を含むプロセグメントを含む；この酵素は、Lys-Argジペプチド切断シグナル配列のカルボキシ側で前駆体タンパク質を切断する。この抗原コード配列は、プレープロー $\alpha$ 因子のリーダー領域に、フレーム内で融合することができる。その後この構築物は、アルコールデヒドロゲナーゼIプロモーター又は解糖プロモーターのようないくつかの強力な転写プロモーターの制御下に置かれる。この抗原コード配列には、翻訳終止コドンが続き、これには転写終結シグナルが続く。

あるいは、この抗原コード配列は、第二のタンパク質コード配列、例えばSJ26又は $\beta$ ガラクトシダーゼなどに融合することができ、アフイニティークロマトグラフィーにより融合タンパク質の精製を促進するために使用される。この融合タ



ンバク質の成分を分離するためのプロテアーゼ切断部位の挿入が、酵母における発現に使用される構築物に適用できる。

哺乳類細胞は、折りたたみ及びシステイン対合、複合炭水化物構造の追加、並びに活性タンパク質の分泌のような、重要な翻訳後修飾にとって好ましい状況におけるタンパク質の発現を可能にする。哺乳類細胞における抗原発現に有用なベクターは、強力なウイルス性プロモーター及びポリアデニル化シグナルの間への抗原コード配列の挿入によって特徴づけられる。これらのベクターは、選択マーカーとして使用するために、ゲンタマイシン耐性又はメトロキセート耐性のいずれかを授ける遺伝子を含むことができる。この抗原及び免疫応答性断片のコード配列は、メトロキセート耐性をコードするベクターを用いて、チャイニーズ・ハムスターの卵巣細胞株

へ導入することができる。形質転換された細胞におけるこのベクターDNAの存在は、サザン分析によって確認することができ、かつ該抗原コード配列に対応するRNAの産生は、ノーザン分析により確認することができる。無傷のヒトタンパク質を分泌することが可能な多くの別の適した宿主細胞株が、当該技術分野において開発されていて、これはCHO細胞株、HeLa細胞、骨髄腫細胞株、Jurkat細胞などを含む。これらの細胞のための発現ベクターは、複製起点のような発現調節配列、プロモーター、エンハンサー、並びにリボソーム結合部位、RNAスプライシング部位、ポリアデニル化部位、及び転写終結配列のような必要な情報処理部位を含む。好ましい発現調節配列は、免疫グロブリン[immunoglobulin]遺伝子、SV40、アデノウイルス及びウシバビロームウイルスなどに由来するプロモーターである。興味深いDNAヒタゲメントを含むベクターは、宿主細胞の種類によって異なる周知の方法により、宿主細胞に転移することができる。例えば、塩化カルシウムトランスフェクション法が、原核細胞で通常使用されている一方で、リン酸カルシウム処理法又は電気穿孔法が、他の宿主細胞に使用されている。

バキュロウイルス/昆虫細胞発現システムに関する材料及び方法は、市販のキットの形で入手でき、特にインビトロゲン社 (San Diego, CA) の "MaxBac" (登録商標 キット) から入手できる。これらの方法は、一般に当業者には公知であ

り、Summers及びSmithの論文 (Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555(1987)) (以後 "Summers及びSmith" と称す) に記載されている。

組換えバキュロウイルス発現ベクターが、いくつかの昆虫細胞への感染に関して開発されている。例えば、組換えバキュロウイルスは、特に *Aedes aegypti*、*Autographa Californica*、*Bombyx mori*、*Drosophila melanogaster*、*Spodoptera frugiperda*、及び *Tr*

*ichoplusia ni* について開発されている (国際特許公開公報第W089/046699号; CarboneIIらの論文、J. Virol.、56:153 (1985) ; Wrightの論文、Nature、321:718(1986) ; Smithらの論文、Mol. Cell. Biol.、3:2156 (1983) 、並びに全般的にFraserらの論文、In Vitro Cell. Dev. Biol.、25:225 (1989) を参照のこと)。

別の哺乳類細胞における抗原発現のためのベクターも使用することができ、例えば、ヒトγインターフェロン、組織プラスミノゲンアクチベーター、血液凝固VIII因子、B型肝炎ウイルス表面抗原、プロテアーゼNexinI、及び好酸球主要塩基性タンパク質の発現のために開発されたものに類似している。更に、このベクターは、哺乳類細胞 (COS7など) において挿入されたDNAの発現のために利用できるCMVプロモーター配列及びポリアデニル化シグナルを含むことができる。

これらのDNA配列は、配列が、発現調節配列に、操作できるように連結、すなわちその機能を確実にするように位置した後に、宿主において発現することができ、これらの発現ベクターは、典型的には、エピソームとして、又は、宿主染色体DNAの組込み部分のいずれかとして、宿主生物において複製可能である。通常、デトラサイクリン耐性又はヒグロマイシン耐性遺伝子のような選択マーカーが、所望のDNA配列により形質転換されたこれらの細胞の検出/選択のために利用される (米国特許第4,704,362号を参照のこと)。

変異体ポリペプチドをコードしているポリスクレオチドは、該コード配列の転写 (発現配列) 及び翻訳を促進する配列を含むことができ、その結果コードされたポリペプチドの産物が生成される。このようなポリスクレオチドの構築は、当

散技術分野において周知である。例えば、このようなポリスクレオオサドは、プロモーター、転写終結部位（真核生物の発現宿主においてはポリアデニル化部位）

、リボソーム結合部位、及び任意に真核生物の発現宿主において使用されるエンハンサー、及び任意にベクターの複製に必要な配列を含むことができる。

#### 精製された抗体

更にPorAと特異的に反応性の精製されたモノクローナル抗体も提供される。これらの抗体は、PorAの独自のエピトープと特異的に反応性であるか、もしくは、これらは同じく他の生物のエピトープと反応することができる。用語“反応性”は、抗原と無作為ではなく結合するか、そうでなければ関連することができることを意味する。本明細書において使用された“特異的に反応性”とは、特定されたあるもの、この場合通常PorA抗原又はその抗原性断片以外の、いずれの抗原とも実質的に交差反応をしないような抗体又は他のリガンドを示している。抗体は、実施例に記したように製造することができる（Marlow及びLaneの論文、Antibodies ; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1988年も参照のこと）。簡単に述べると、精製された抗原を、動物に、免疫応答を惹起するのに十分な量及び間隔で注射する。抗体を直接精製するか、もしくは、脾細胞を動物から得るか、のいずれかである。その後これらの細胞は、不滅化した細胞株に融合し、かつ抗体分泌についてスクリーニングする。

抗体は、基質に結合するか、又は、検出可能な部分により標識するか、もしくは結合及び標識の両方を行うことができる。本発明の組成物によって意図されている検出可能な部分は、以下の診断法の説明に列記しているものであるが、蛍光的、酵素的及び放射性マーカーを含む。

#### 基質に結合した抗原

抗原と特異的に反応性である基質及びリガンドに結合した精製されたPorA抗原も、意図されている。このような抗原と特異的に反応性である精製されたリガンドは、抗体であることができる。抗体は、常法及び本明細書に記したように、得

られたモノクローナル抗体であることができる。モノクローナル抗体は、その目的のために特異的に産生されたハイブリドーマ細胞株により分泌することができる（Harrow及びLane, 1988）。同様に、該抗原と特異的に反応性であるヒト以外のモノクローナル抗体も、本発明の範囲内である。このポリクローナル抗体も、標準的免疫感作及び精製のプロトコールにより得ることができる（Harrow及びLane, 1988）。

#### 抗原による抗体を検出する血清学的検出法（診断） [Diagnosis]

本発明は、対象におけるPorA抗原を有するC. jejuni株の存在の検出法で、対象から得た抗体を含有する検体を、検出可能な量の本発明のPorA抗原性断片と接触する工程、及びこの断片と抗体の反応を検出する工程を含み、この反応がC. jejuni株の存在又は過去のC. jejuni株の感染を示すような方法を提供する。

#### 抗体／リガンドによる抗原の検出

PorA抗原を有するC. jejuni株の検出法の一例は、対象から得た液体又は組織検体を、抗原と特異的に反応性である精製された抗体のある量と接触し、かつ抗原とのこのリガンドの反応を検出することによって実施される。この抗原が、抗原を含む無傷の細胞上にあるか、もしくは、微抗原の断片であることも意図されている。本明細書において意図されているように、この抗体は、該抗原と結合するあらゆるリガンド、例えば、無傷の抗体、抗体の断片、又は該抗

原と反応性である他の試薬などを含んでいる。本方法の液体検体は、抗原、又は抗原を有する細胞を含むあらゆる体液、例えば血液、血漿、血清、唾液及び尿を含む。他の可能性のある体液の例は、痰、鼻汁、胃液などである。

#### ELISA

免疫蛍光アッセイ(IFA)、並びに酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)及びイムノプロットイングのようなエンザイムノアッセイを、抗原の検出を行うために容易に適用することができる。抗原の検出に有効なELISA法は、例えば、次のようなものである：(1)抗体を基質に結合する工程；(2)この結合した抗体を、該抗原を含有する液体又は組織検体に接触する工程；(3)前述のものを、検出可能な部分に結合した第二抗体に接触する工程（例えばホースラディッシュペルオキシ

ダーゼ酵素又はアルカリホスファターゼ酵素)；(4)前述のものを酵素基質と接触する工程；(5)前述のものを発色剤と接触する工程；(6)色の変化を観察する工程である。前述の方法は、抗体更には抗原を検出するために、容易に変更することができる。

#### 競合的阻害アッセイ

C. jejuniが発現するPorA又は過去のC.jejuni感染を検出するために使用することができ、別の免疫学的手法は、PorA抗原と特異的に反応する抗体を検出するためのモノクローナル抗体(MAb)を利用する。簡単に述べると、対象の血清又は他の体液を、基質に結合した抗原と反応させる(例えばELISA 96-ウェルプレート)。過剰な血清は、完全に洗浄除去する。次に標識した(酵素-結合、蛍光、放射線など)モノクローナル抗体を、先に反応させた抗原-血清抗体複合体と反応させる。モノクローナル抗体の結合の阻害量を、対照(非感染患者の血清抗体)に対して測定した。モノクローナル抗体の阻害の程度は、これがモノクローナル抗体結合特異性を基にしている、特定の変種又は菌株について非常に特異的な試験である。WAbも、IFAによる細胞中の直接の検出に利用することができる。

#### 微量凝集アッセイ

微量凝集試験は、対象におけるC. jejuni株の存在を検出するために使用することができる。簡単に述べると、ラテックスビーズ(又は赤血球細胞)を、PorAで被覆し、かつ対象から得た検体と混合し、その結果、該抗原と特異的に反応する組織又は体液中の抗体が、抗原と交差結合し、凝集を引き起こす。この凝集された抗原-抗体複合体は、肉眼又は分光光度計によって可視できる沈殿を生じる。前述の試験の変法において、抗原と特異的に反応する抗体は、ビーズ及び組織又は体液中の抗原に結合することができ、これにより検出される。

#### サンドイッチアッセイ/フローサイトメトリー/免疫沈降法

更に典型的サンドイッチアッセイのように、抗体は、基質に結合することができ、かつ抗原と反応させる。その後、第二の標識された抗体が、第一の抗体では認識されないエピトープに結合し、かつこの第二の抗体を検出する。本発明は

C. jejuni又は過去のC. jejuni感染の検出のためのPorA抗原を提供するので、他の血清学的方法、例えばフローサイトメトリー及び免疫沈降法なども、検出法として使用することができる。

本明細書に示した診断法において、抗原は、基質に結合され、か

つ血清、尿、唾液又は胃液のような液体検体と接触させられる。この検体は、患者から直接、又は一部精製された形で採取することができる。この方法では、抗原に特異的な抗体(一次抗体)は、結合した抗原と特異的に反応する。その後、検出可能な部分に結合されるか、標識されるかした二次抗体が、一次抗体の検出を増強するために追加される。一般に、抗原の異なるエピトープに特異的、もしくはリガンド又は反応した抗体に非特異的のいずれかで反応性である二次抗体又は他のリガンド[ligand]は、一次抗体上の複数の部位と反応する能力について選択されるであろう。従って、例えば二次抗体のいくつかの分子が、各一次抗体と反応することができ、より検出し易い一次抗体を作成する。

#### 検出可能な部分

この検出可能な部分は、沈殿又は変色という視覚的検出、顕微鏡による視覚的検出、又は自動化された分光光度計による検出、放射能測定などで可能になる。検出可能な部分の例は、蛍光及びローダミン(蛍光顕微鏡)、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(光学顕微鏡又は電子顕微鏡、及び生化学的検出のいずれか)、ピオチン-スプレトブレプトアジン(光学顕微鏡又は電子顕微鏡)、及びアルカリホスファターゼ(色の変化の生化学的検出)を含む。使用したこれらの検出法及び部分は、例えば、このような選択に適用される標準的基準(Harrow及びLane, 1988)により、前述の一覧又は他の適当な例から選択することができる。

#### 治療法

本発明の組成物を用いる対象におけるC. jejuni腸炎の治療法が提供されている。例えばこのような方法のひとつにおいて、対象中

のPorA抗原に結合しかつ対象の臨床状態を改善するのに十分なC. jejuniのPorA抗原と特異的に反応するリガンドの量を、対象に投与する。このような改善は、

細胞接着性の炎症及び細胞損傷を誘導することにおいて、該抗原の正常な機能をリガンドが妨害した結果である。このリガンドは、該抗原と特異的に反応する複製されたモノクローナル抗体、ヒト以外の動物に由来した複製されたポリクローナル抗体、又は該抗原と特異的反応性を有する他の薬物であることができる。これに加えて、細胞傷害性部分は、常法によりリガンド／抗体に複合され得る。細胞傷害性部分の例は、リシンA鎖、ジフテリア毒素及び放射性同位体を含む。

C. jejuni腸炎の対象を治療する別の方法は、リガンド／C. jejuniのPorA抗原受容体のアンタゴニストを、該受容体と反応しかつ受容体へのPorA抗原の結合を妨げるのに十分な量、対象に投与することを含む。結果は、対象の臨床状態を改善する。あるいはこの治療法は、PorA受容体のアナログを、PorA抗原との競合的結合を生じる量投与し、その結果PorA抗原のその野生型受容体との結合を阻害することを含む。この受容体は、腸粘膜、例えば上皮細胞、炎症細胞又は内皮細胞に局在している。

#### ワクチン

本発明のPorA抗原は、免疫原性を示す量の抗原及び医薬として許容できる担体を含むワクチンの構築において使用することができる。このワクチンは、抗原全体、無傷のC. jejuni、E. coli[cold]又は他の菌株上の抗原であることができる。その後このワクチンは、C. jejuni感染症の治療に使用することができる。前述のように、C. jejuniの突然変異体も使用することができる。

抗原の免疫原性を示す量は、常法を用いて決定することができる

。簡単に述べると、様々な濃度の予想される特異的免疫反応性のエビトープを調製し、動物に投与し、かつ各濃度に対する動物の免疫応答（例えば抗体産生）を調べる。

本発明のワクチンにおける医薬として許容できる担体は、生理食塩水又は他の適当な担体を含む(Arnon, R. (編集) Synthetic Vaccines I:1 83-92, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1987年)。アジュバントも、このワクチンの担体の一部として使用することができる。この場合、使用した抗原、投与形式及び対象を基に標準的基準(Arnon R. (編集)、1987年)によって選択することができる

きる。投与方法は、使用される具体的なワクチン及び投与を受ける対象に応じて、経口又は舌下、もしくは注射によることができる。前述のことから、ワクチンは、予防（感染の防止）又は治療（感染後の疾患の治療）の様式で使用するることができることが理解される。

従って、本発明は、対象に前述のワクチンを投与することによる、C. jejuni感染症及び関連した疾患を予防又は治療する方法を提供する。

このようなワクチンは、抗原又は抗原類を、通常該組成物を受け取る対象にとって有害な抗体産生をそれ自身誘発しないような担体のいずれかを含む“医薬として許容できる担体”と組合せて含有する。適当な担体は、典型的には、巨大な、緩徐に代謝されるマクロ分子、例えばタンパク質、多糖類、ポリ乳酸、ポリ乳酸、アミノ酸重合体、アミノ酸重合体、脂質凝集体（例えば油滴又はリポソーム）、及び府活性ウイルス粒子などである。このような担体は、当業者には周知である。これに加えて、これらの担体は、免疫賦活剤（“アジュバント”）として機能することができる。更に[Purthemore] この抗原は、ジフテリア、破傷風、コレラ、H. pyloriなどの病原菌由来のトキシノイドのような、細菌トキシノイドと複合

することができる。

この組成物の効果を増強する好ましいアジュバントは、以下を含むが、これらに限定されるものではない；(1)アルミニウム塩（ミョウバン）、例えば水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムなど；(2)水中油型乳化剤（ムラミルペブゾドのような他の特異的免疫賦活剤、又は細菌細胞壁の成分を伴う、もしくはは、伴わない）であり、例として、(a)MF59（国際特許公開公報第WO 90/14837号）であり、これはスクアレン5%、ツイーン（登録商標）80を0.5%、及びスパン（登録商標）85を0.50%（任意に様々な量のMTP-PEを含有するが、必須ではない）を含み、モデル110Y微量流動装置(Microfluidics, Newton, MA)のような微量流動装置を用いて、サブミクロン粒子に製剤されたもの、(b)SAF、スクアレン10%、ツイーン（登録商標）80を0.4%、プロリン酸[pluronic]プロック重合体L121を5%、及びthr-MDPを、サブミクロン乳化剤に微量流動化する

か、もしくは、比較的大きい粒度の乳化剤を製造するために激しく攪拌するかしたものの、並びに(c)Ribitアジュバントシステム(RAS)(Ribit Immunochem, Hamilton, MD)で、これはスクアレン2%、ツイン80を0.2%、並びにモノホスホリビドAQM PL<sub>2</sub>、トレハロースジミコレート(TDM)、及び細胞壁骨格(CWS)からなる群からの1種以上の細菌細胞壁成分を含み、好ましくはMPL-CWS (Detox) であるもの；(3)リポニアンアジュバント、例えばStimulon (Cambridge Bioscience, Worcester, MA)、又はこれから製造された粒子、例えばISCOM (免疫賦活複合体)を使用することができる；(4)完全フロイントアジュバント及び不完全フロイントアジュバント(CFA)；(5)サイトカイン、例えばインターロイキン (IL-1, IL-2など)、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、腫瘍壊死因子(TNF)など、並びに(6)散乱成分の効果を増強するために免疫賦

活剤として作用する他の物質である。ミョウバン及びMF59が好ましい。

ムラミルペプチドは、N-アセチル-L-アラニル-L-アラニル-L-スレオニル-D-インソグタルミン(thr-MDP)、N-アセチル-L-アラニル-L-アラニル-D-インソグタルミン(nor-MDP)、N-アセチル-L-アラニル-L-アラニル-D-インソグタルミン-L-アラニン-2-(1',2'-ジバルミイル-Sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ) エチルアミン (MTP-PE)などを含むが、これらに限定されるものではない。

前述の免疫原性組成物(例えば抗原、医薬として許容できる担体、及びアジュバント)は、典型的には、水、生理食塩水、グリセロール、エタノールなどの希釈剤を含むであろう。これに加えて、湿潤剤又は乳化剤、pH調節剤などのような副成分が、このような賦形剤中に存在することができる。

典型的には、この免疫原性組成物は、溶液又は懸濁液のいずれかで、注射可能なように調製され；注射前に液体担体中に溶解、懸濁するのに適した固形剤形でも調製することができる。この製剤は、更に、アジュバントの効果を増強するため、乳化するか、もしくは、リボソーム内に封入することができる。

典型的なワクチンとして使用される免疫原性組成物は、免疫学的有効量の抗原性ポリペプチド、更には必要に応じて他の前述の他の成分を含有する。“免疫学的有効量”とは、対象にこの量を、単回投与又は一連の投与の一部としてのい

れかで投与した場合に、治療又は予防の効果があることを意味する。この量は、治療を受ける対象の健康及び生理的状态、治療を受ける対象の分類群(例えばヒト以外の霊長類、霊長類など)、対象の免疫系の抗体を合成する能力、望ましい保護の程度、ワクチン製剤、治療に当たる医師の医学的状況の評価、及び他の関連する要因に応じて変動する。この量は、通常の検査によって決定することができる比較的に広い範囲に納まることが予想される。

前述の免疫原性組成物は、便利なことに非経口、例えば皮下又は筋肉内のいずれかの注射で投与される。他の投与様式に適した別の製剤は、経口及び肺への製剤、坐薬、経皮的塗布を含む。治療の投与計画は、単回投与スケジュール又は反復投与スケジュールであることができる。ワクチンは、他の免疫調節剤と併用投与することができる。

核酸検出法 (診断)

PorA抗原及びPorA抗原を有するC. jejuniの存在も、該抗原に特異的な核酸の存在を検出することによって決定することができる。該抗原に対するこれらの配列の特異性は、一覽のヌクレオチド配列について問題の遺伝子と類似のものを検索するコンピュータプログラムであるGenetics Computer Group (Madison, WI)のWord Search or FASTAを用いて、コンピュータのデータベースであるGenBankで一覧作成された公知の配列と、コンピュータによる比較を行うことによって決定することができる。

前述の抗原に特異的な核酸は、ポリメラーゼ連鎖反応又はリガーゼ連鎖反応のような核酸増幅法を用いて決定することができる。あるいはこの核酸は、直接のハイブリダイゼーション又は制限断片長の多型を用いて、検出することができる。例えば本発明は、制限エンドヌクレアーゼの切断部位に関連したヌクレオチド配列の存在を確定する工程を含む、PorA抗原を有するC. jejuniの存在の検出法を提供する。これに加えて、該抗原に特異的な核酸とのみハイブリダイゼーションするようなPCRプライマーを使用することができる。増幅の存在は、抗原の存在を示す。別の実施態様において、DNA

検体の制限断片を、例えばSanger ddNTPシークエンシング又は7-デオキシ-2'-デオキシグアノシン-5'-トリリン酸及びTaqポリメラーゼなどを用いて直接配列決定し、C. jejuniを検出するために公知の独自の配列と比較することができる。別の実施態様において、本発明は、前述の方法に従った選択的増幅による、C. jejuniの存在の検出法を提供する。更に別の実施態様において、C. jejuniは、独自の配列の、PorA選択性核酸のプロープによる、直接のハイブリダイゼーションにより検出される。

更にこのヌクレオチド配列は、前述の方法によるハイブリダイゼーション前に増幅することができる。

一旦特定の配列がC. jejuniに関連することが示されたならば、特異的配列を検出する方法は、当該技術分野において標準的なものである。直接プロービング法を用いる特異的配列の決定法は、例えば合成により、もしくは、ニックトランスレーションにより調製することができるオリゴヌクレオチドプロープの使用に関連している。これらのプロープは、その後のサザンブロットハイブリダイゼーション法の例などにおいて可視化するために、放射性標識、酵素標識、蛍光標識、ビオチン-アビジン標識などを用いて、適当に標識することができる。標識されたプロープは、例えば完全に相補的配列のみをハイブリダイゼーションするような条件下でニトロセルロースシートに結合した検体DNAと反応する。標識したDNAプロープと相補的なDNA配列を有する領域は、再アニーリング反応の結果としてそれら自身が標識される。

次にこのような標識を示すフィルターの領域は、オートラジオグラフィなどにより可視化することができる。この標識プロープは、例えば完全に相補的配列のみがハイブリダイゼーションするような条件下でニトロセルロースに結合したDNA検体と反応する。ハイ

ブリダイゼーションの緊縮度は、通常、所定の鎖長のTi（プロープとその標的配列の間に形成されたハイブリッドの不可逆的融点）以下のT<sub>0</sub>である。20merについて、推奨されるハイブリダイゼーション温度は、約58℃である。洗淨温度は、

調べている配列に独自のものであり、各変種について最適化する必要がある。

代りのプロービング法、例えばリガーゼ連鎖反応(LCR)は、一致しないプロープ、すなわち、その突然変異点以外は標的と完全に相補性があるプロープの使用に関連している。その後のこの標的配列を、完全に相補的であるオリゴヌクレオチド、及び不一致を含むオリゴヌクレオチドの両方と、これら2種を区別するような条件下で、ハイブリダイゼーションすることができる。反応条件を操作することによって、完全に相補的なものだけのハイブリダイゼーションを得ることが可能である。不一致が存在する場合は、ハイブリダイゼーションが著しく減少する。

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)は、驚くべき効率で特異的DNA配列を増幅する技術である。変性、プライマーアニーニング及び伸長の繰り返しサイクルが、ポリメラーゼ、例えば熱に安定な酵素Taqポリメラーゼにより行われ、所望のDNA配列濃度の指数関数的増加をもたらす。突然変異のヌクレオチド配列がわかっているならば、問題のDNAに隣接する配列に相補的な合成オリゴヌクレオチドを調製することができる。各オリゴヌクレオチドは、2本鎖の一方と相補性がある。このDNAは、高温（例えば95℃）で変成することができ、その後オリゴヌクレオチドの非常に過剰な分子の存在下で再アニーリングされる。これらのオリゴヌクレオチドは、互いに向かつてその3'末端に配置され、標的配列のもう一方の鎖をハイブリダイズされ、かつ4種のデオキシリボヌクレオチドトリリン酸の存在下で、核酸鎖型に沿って酵素的伸長を起動される。その後最終生成物は

、別のサイクルのために再度変性される。この3工程サイクルが数回繰り返された後、100万倍以上にも及ぶDNAセグメントの増幅が達成される。次に得られるDNAを、何らかの遺伝子の変更を突き止めるために、直接配列決定することができる。あるいは、変更されたDNAとのみ結合するようなオリゴヌクレオチドを調製することが可能であり、その結果、PCRは、突然変異が存在する場合にのみ、DNAの増大を生じるであろう。PCRの後、対立遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションの直接的可視化を用いて、集団発生(outbreak)に関連したC. jejuni株を分類(typing)することができる。あるいは特異的対立遺伝子

の増幅と称されているPCRの変法(PASA)を使用することができ；これは、1個の塩基対が異なる対立遺伝子間の迅速かつ確かな区別のために、差別的な増幅を用いる。大きいコピー数を達成するためにRNAポリメラーゼを使用する3SRのような別の技術も、適当ならば使用することができる。

更に別の方法において、PCRに続けて、制限エンドヌクレアーゼによる消化、それに続く得られた生成物の分析を行うことができる。ヌクレオチドの置換は、特異的エンドヌクレアーゼの制限部位の獲得又は喪失を生じることができる。制限エンドヌクレアーゼ認識部位の獲得又は喪失は、制限断片長の多型(RFLP)分析を用いるが、もしくは、関心のある配列に伸びる(span)ようなPCR生成物における多型性のあるエンドヌクレアーゼ制限部位の有無を検出することによって、集団発生に関連したC. jejuni株の分類を促進する。

RFLP分析に関しては、例えばC. jejuni有することが疑われる対象の糞便、又は対象から単離したC. jejuniから、DNAが得られ、エンドヌクレアーゼの制限部位で消化され、かつ引き続きアガロースゲル電気泳動により分離される。その後サザンブロット法を用い

、標識したプローブでハイブリダイゼーションすることにより、エンドヌクレアーゼ消化の生成物を検出することができる。その後サザンブロット法から得られたパターンを比較することができる。このような方法の使用により、検出された多くの帯を決定し、かつこれをC. jejuniの集団発生に無関係のC. jejuni株由来のDNAの数と比較することにより、PorA DNAが検出される。更に制限エンドヌクレアーゼを、PorA遺伝子における突然変異の効果的な検出のために使用することができ。

明らかにされた突然変異部位でのヌクレオチド置換による別の制限部位の同様の形成は、制限エンドヌクレアーゼによって認められた遺伝暗号及びヌクレオチド配列のリストを参照して容易に算出することができる。

一般に、PCR及びLCRのためのプライマーは、通常長さが約20bpであり、好ましい範囲は15～25bpである。両方のプライマーが同じ長さで、概して同じヌクレオチド組成である場合に、より良い増幅が得られる。二本鎖の変性は、通常94℃で

起こり、プライマー伸長は72℃で起こる。アニーリング温度は、調べている配列によって変動する。反応時間の例は次のようなものである；変性20分間；アニーリング、伸長及び変性の2分、1分、1分の35サイクル；及び最後に5分間の伸長工程。特異的対立遺伝子のPCR増幅(PASA)は、1個の塩基の突然変異又は多型を検出する迅速な方法である。PASA (対立遺伝子特異的増幅としても公知) は、一方は対立遺伝子に特異的でないような、2個のオリゴヌクレオチドプライマーによる増幅に関連している。

望ましい対立遺伝子は、効果的に増幅される一方で、別の対立遺伝子 (複数) は、対立遺伝子に特異的プライマーの3'末端の、又はその近傍の塩基と一致しないので、余り増幅されない。従って、PA

SA又はPAMSAに関連した方法を用いて、本発明の突然変異配列を特異的に増幅することができる。このような増幅がC. jejuni単離体又は集団発生時の対象から得た検体において行われた場合、集団発生の原因に寄与する菌株の突然変異の存在を検出する方法として利用することができる。

前述のように、リガーゼ連鎖反応(LCR)として公知の方法を用いて、1個の塩基の置換を良好に検出することができる。LCRプローブは、複数の異なる突然変異体の同時スクリーニングと組合せる、又は、複合することができる。従って、LCRは、この場合のように、複数の突然変異体が、集団発生に特に関連したC. jejuni株について予想される場合に、特に有用である。

#### 抗原検出キット

本発明はC. Jejuni株による感染を診断するためのキットを提供する。特に、本キットは抗体またはその免疫反応性の断片と特異的に反応するPorA抗原を検出できる。キットは基質と結合する抗体、抗原と反応する二次抗体と抗原と二次抗体の反応を検出するための試薬を含むことができる。この様なキットはELISAキットであり、必要に応じて基質、一次ならびに二次抗体と、上記の如くの検出成分として必要なその他の試薬、酵素基質と発色試薬を含むことができる。

あるいは、診断キットは通常本発明記載の成分と試薬を含むイムノブロットキットである。

抗体検出キット

本発明の診断キットはPorAまたはその抗原性断片と特異的に反応する一次抗体の存在を検出するのに利用できる。キットは基質と結

合する抗原、PorA抗原と特異的に反応する抗体と反応する二次抗体と一次抗体と二次抗体の反応を検出するために試薬を含むことができる。この様なキットはELISAキットであり、必要に応じて基質、抗原、抗体、一次ならびに二次抗体と、上記の如くの検出成分として必要なその他の試薬、酵素基質と発色試薬を含むことができる。あるいは、診断キットは通常本発明記載の成分と試薬を含むイムノプロットキットである。

核酸検出（診断）キット

PorA抗原のヌクレオチド配列が決まれば、核酸の検出のための基質と試薬の様な一般的なキット成分を含む抗原特異的なヌクレオチド配列を検出するための本発明の診断診断キットも作ることができる。C.jejuni感染は小腸と便中にある抗原に特異的な核酸を検出することで診断できるので、特異的核酸プローブ、プライマーまたは制限酵素断片長多形の様な核酸検出法を分析に利用したキットを作ることができることは当業者に公知であろう。本診断キットはさらに陽性コントロール試験と陰性コントロール試験を含むことが考えられる。本発明による診断キットに含まれる特別な試薬とその他の成分は、キットに於いて実行される具体的な診断方法に従い、当業者が利用可能なものの中から選択することができる。この様なキットを利用して、被検体の組織サンプルや液体サンプル中の抗原を検出することができる。

以下の実施例は例示を目的としており、本発明を限定するものではない。これらは使用できる典型例であるが、当業者公知の他の方法もまた実施できる。

以下、実施例にて本発明が興った試験と実験を開示する。

実施例

実施例1・

材料と方法

細菌株と培地

C.jejuni株2483は胃腸炎の患者より分離したもので(23,24)、porin遺伝子(porA)の局在決定と配列決定に用いた。本生物は患者より分離した後に、5%ヒツジ血液(TSA)を含む典型的なダイズ寒天上で2回継代し、それから5%のヒツジ血液を含む典型的なダイズ寒天中に-70℃に保存した。Campylobacter sp. 株と関連菌は、Laboratory Center for Disease Control, Ottawa, Canadaのリフレンスコレクションの一部として、グリセロールベープトン水中に-80℃に維持されていた。

ベクター作成ポリメラゼチェーンリアクション(PCR)

J.jejuni株2483のゲノムDNAを既報(25)に従い精製した。合計15μgのゲノムDNAを制限酵素BamHI、EcoRI、NheI、SpeI、XbaI、HindIII、BglIIとBclI(Boehringer Mannheim, LaVerne, Quebec, Canada)、120Uで2時間、37℃消化した。ベクター作成オリゴヌクレオチド、ベクター作成共通プライマーと変性プライマーはOligo<sup>®</sup>1000DNA合成装置(Beckman, Fullerton, Ca)で合成し、表1に一覧した。

表1

C.jejuni株、2483のporin遺伝子の中のporA遺伝子の中のベクター作成PCRと配列決定に使用したプライマー。

RとFはプライマーの方向、逆向きと前向きを示す。



プライマー名	配列	配列番号
3'-VP	5'-CTCTCCCTTCTCGAATCGTA ACCGTTCGTACGAGATC-GCTG TCCTCTCCTC-3'	4
5'-BamHI	5'-GATCGAAGGAGAGACGCTG TCTGTCGAAGGTAAAGGAAACGGAG GAGAGAAAGGAGAG-3'	5
5'-EcoRI	5'-AATTGAAGGAGAGACGCTG TCTGTCGAAGGTAAAGGAAACGGAG GAGAGAAAGGAGAG-3'	6
5'-HindIII	5'-AGCTGAAGGAGAGACGCTG TCTGTCGAAGGTAAAGGAAACGGAG GAGAGAAAGGAGAG-3'	7
5'-NheI	5'-CTAGGAAGGAGAGACGCTG TCTGTCGAAGGTAAAGGAAACGGAG GAGAGAAAGGAGAG-3'	8
UVP	5'-CGAATCGTAACCGTTTCGTAC GAGAAATCGCT-3'	9
p-1F	5'-GGTAAATTTTGATAAAAATTT-3'	10
p-2F	5'-GATACAGGTAAATTTGATAA-3'	11
p-3F	5'-GAAAGAGCTATCAAAAGATGT-3'	12
p-4R	5'-TGCCACCATCAACACGGTTG-3'	13
p-6R	5'-TAAAGTAAGCACCTTCAAGTG-3'	14
p-7R	5'-ACTTGTGCTCTATATTTGTG-3'	15
p-10F	5'-TGATAGCGAAGCTTGATGATA-3'	16
p-13R	5'-AGCATCCCAACCATTTACTT-3'	17
p-14F	5'-TGACTTCGTATATGCTGGAA-3'	18

p-15F	5'-CTCCAAAATTTATGTGCTACA-3'	19
p-16R	5'-CTATCAAAATTTCCAACTTCT-3'	20
p-17F	5'-TGAAGATGTTGCTACAAAGTG-3'	21
p-18R	5'-CTACTCTTGCACACAGCTTCA-3'	22
p-19F	5'-CTTCAAAAGCTTTCATTCAGT-3'	23

既報の概要の如く(10)共通リンカーは各10mMの濃度の脱リン酸化した57-merのトップ鎖と53-merのボトム鎖(3'-VP)を65℃、2分間、続いて20分間かけて37℃まで冷却してアニーリングさせる。各消化物から30 $\mu$ lの連結混合体を作成し、消化したゲノムDNA2.5g、対応する末端にアニーリングした共通リンカー1 $\mu$ l(即ち、5'-BamHI-を持つBamHI消化ゲノムDNA)、1mMTP、10UT4DNAリガーゼ(Boehringer Mannheim)と10mMDTTを含むそれぞれを一晚、15℃にて反応させた。

バクテリアライブラリーのポリメラゼチエインリアクションと逆PCR

アミノ酸残基(3, 3'番、ベージXX)23番ないし29番、21番ないし27番と4番ないし10番よりそれぞれプライマーp-1F、p-2Fとp-3Fを作成した。プライマーは、Genebankを通じて入手できるコードン使用チャートの助けをかりてそれぞれ同義性が2, 4, 6になる様に設計した。各変性プライマー(表1)1 $\mu$ Mに1 $\mu$ Mの共通プライマー(UVP)、100 $\mu$ lの10 $\times$ PCR緩衝液(500mM KCl、100mM Tris-HCl(pH8.3)、1%Triton<sup>®</sup>X-100、30mMのMgCl<sub>2</sub>)、各dNTPを200mM含む保存液200 $\mu$ l、20UのTaqポリメラゼ(Promega, Madison, WI)を加えて3種類のPCR反応混合液を調整した。滅菌したddH<sub>2</sub>O

0を加えて最終容量を1mlにした。各連結混合体5 $\mu$ lをPCR反応混合液50 $\mu$ lに加え、PE9600サーマルサイクラー(Perkin-Elmer, Foster City, Ca)にかけて初回融解温度を95℃2分、ついで95℃30秒、55℃30秒、72℃2分のサイクルを35回繰り返し、さらに72℃2分間の伸長を行い、増幅した。PCR反応体と100bpラダー(GibcoBRL, Grand Island, NY)を、1XTAE緩衝液中に1%低融点アガロース(LMP)(Gibco BRL)電気泳動し、エチジウムブロマイドで30分間染色した。PCR産物をアガロースから切り出し、Promega<sup>®</sup> PCRPreps DNA精製システム(Promega)を利用して抽出した。

逆向きPCRは、まず2.5 $\mu$ lのHindIII消化ゲノムDNAに6 $\mu$ lの100mMDTT、6(1の10mMのATP、50 $\mu$ lのリガーゼ(Boehringer Mannheim)、6 $\mu$ lのリガーゼ緩衝液(Boehringer Mannheim)と滅菌ddH<sub>2</sub>Oを加え、最終容量60 $\mu$ lにした。この混合液を一晚15℃において連結した。連結後、p-3Fとp-7Rプライマー(表1)を利用した35サイクルの上記PCRを実施した。PCR産物を1%LMPゲル上に走らせ、エチジウムブロ

マイドで染色した。アンブリコンをPromega™ PCRPrep DNA精製システム (Promega) で抽出し、DNA配列を決定した。アンブリコンはPrism™色素ターミネーターサイクルシーケンシングキット (Applied Biosystems) を利用して、ABI377自動DNAシーケンサー (Applied Biosystems, Foster City, Ca) でDNA配列を決定した。DNA配列の解析はSequencher™ 3.0 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI) とPC/Gene (IntelliGenetics, Mountain View, Ca) を用いて行った。

#### ゲノムDNAのサザンブロット解析

上記掲載の制限酵素を利用したC.jejuniゲノム消化を準備し、一晚、37℃で消化を行った。電気泳動前に、HindIII消化したラムダ

DNAをランダムラムバリングキット (Boehringer Mannheim) を用いてジゴキシグニン-11-ウリジン-5'-3リン酸で1時間、37℃で標識した。消化されたDNAを1×TAE緩衝液中にHindIIIで消化したラムダDNAラダー (Boehringer Mannheim) と共に1%アガロースゲル (Gibco) 上で電気泳動した。ゲル電気泳動後、ゲルをまずオービタルシェーカー上で変性液 (0.5MのNaOH、1.5M NaCl) 中に1時間、室温置いて、その後同条件下に1時間、中和液 (0.5M Tris-HCl, pH7.5, 1.5M NaCl) に入れた。Posiblot™ システムを利用して75mHg, 90分 (Stratagene, Aurora, Ontario, Canada) ゲノムDNAをHybond™-N+ナイロンメンブレンに写し取った。

転写後、UV Stratalinker™ 2400 (Stratagene) でUV交叉結合させる前にメンブレンを2×SSCで一度洗浄した。交叉結合したメンブレンを10mlのブレハイブリダイゼーション液 (Gibco BRL) 液中に55℃、1時間おいてブレハイブリダイゼした。p-3Fとp-6Rプライマー (表1) より得たPCRアンブリコンを1μl MPから抽出し、サイクル数を35回から15回に変更した以外はバクテリ化PCRと同PCR条件下に、10-25ngをPCRジゴキシグニン-ラベリングキット (Boehringer Mannheim) を用いてジゴキシグニン-標識した。およそ50ngのラムダラダーブロープとジギシグニン-標識された細胞傷害性蛋白ブロープを100℃で10分間熱変性し、氷上に5分間おいてからハイブリダイゼーション液に加えて55℃で一晚おいた。

ハイブリダイゼーション後、メンブレンを0.1%のSDSを含む2×SSC液中で室温、15分の洗浄を2回行い、次いでまず0.1% SDSを含む1×SSC、次に0.1% SDS

を含む0.1×SSC中、55℃の洗浄をそれぞれ15分づつ行った。洗浄したメンブレンは、1時間1:5000希釈のアルカリフォスファターゼ (Boehringer Mannheim) 標識抗-ジゴキシグニン抗体に加える前に、オービタルシェーカー上の5%ブロッッキング液 (Boehringer Mannheim) 中に1時間置いてブロッッキングした。この膜を低塩Tris-緩衝生理食塩水 (TBS) で5分づつ3回洗浄し、0.1M Tris-HCl, pH9.5, 0.1M NaClと50mMのMgCl<sub>2</sub>を含む洗浄緩衝液で1:20に希釈されたCPD-Starルミゲン基質 (Tropix, Bedford, Ma) 中に5分間置いた。メンブレンを高性能オートラジオグラフィフィルム (Hyperfilm-MP™) (Amersham) に、適当なバンド強度が得られるまで暴露した。

#### ポリン遺伝子のクローニングとDNA配列の決定

細胞毒性ブロープと反応するSpeIで消化されたゲノムDNA酸をLMPゲルより切り出し、Gneclen™ (Bio101, Lajolla, Ca) を用いて抽出した。ベクター挿入の至適濃度を決定するために、各種濃度の挿入体を、2.5UのT4DNAリガーゼと1mMのATP (Promega) で、XbaIで消化されアルカリフォスファターゼ (Promega) で処理されたpUC19 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 50ngと15℃、一晚連結した。メーカー (Stratagene) の指示に従い合計50ngのベクターを利用してEpicurian coti XL1-blueコンパネント細胞を形質転換し、100μlを200μg/mlのアンピシリンを含むLuriaブロス (LB) 寒天プレートに撒いた。発色させるために、プレートを50μlの20ng/mlのハロゲン化インドリル-β-D-ガラクトサイド (B1uo-gal) と15μlの0.5Mのインゾプロブイルチオ-β-ガラクトサイド (IPTG) (GibcoBRL) で置いた。形質転換体を加える前にこれらを乾燥させた。

形質転換体をプレートから拾い上げ、一晚200μg/mlのアンピシリンを含むLB3ml内で増殖させた。Promega™ miniprep DNA精製システム (Promega) を用いて1.5mlの培養液についてプラスミッド調整を行った。SpeI連結からの精製プラスミッド合計50ngをp-3Fとp-6Rを含むPCR混合体に加え、上記同一方法により増幅した。反応体

TAE緩衝液中に1%アガロースゲル上に電気泳動し、エチジウムブロマイドで

染色した。陽性クローンからのプラスミドを表1掲載のプライマーを利用した上記方法により配列決定した。porinプロープと同一方法を利用し、プライマーp-15Fとp-16Rを用いてゲノムDNAのPCRを行った。

porin遺伝子と細胞毒性製造用C.jejuni分離体のスクリーニング

株2483 (表2) を含む合計30のc.jejuniと関連株を10%のヒツジ血液を含むトリプシン処理ダイズ寒天上に48時間、微小無酸素環境下に増殖させた。

表 2

C. jejuni株2483より配列決定されたのporin遺伝子に特異的なプライマーを利用した細胞毒性の表現形発現とporAの存在に関するC.jejuni20株のスクリーニング (表内NT=試験せず; ND=測定せず)

生物	LCDC 番号	分離源	Lior 血清型	バイオ タイプ	毒素 陽性	PCR 陽性
C. jejuni	3454	ヒト	4	Ia	+	+
	3969	ND	判定不能	I	+	+
	4951	ヒト	7	I	+	+
	4966	ヒト	7	I	+	+
	6847	ヒト	7	Ia	+	+
	7049	ニワトリ	61		+	+
	7288	水	9	II	+	+
	8916	ヒト	94	IIa	+	+
	9214	ヒト	2	Ia	+	+
	9541	水	82	II	+	+

	9543	水	82	II	+	+
	9555	ヒト	23	I	+	+
	10403	ヒト	36	Ia	+	-
	10673	ヒト	82	II	+	+
	14040	ヒト	82	II	+	+
	14906	ヒト	82	I	+	+
	15151	ヒト	82	I	+	+
	16323	ウシ	82	I	+	+
	16334	ヒト	82	II	+	+
	16336	ヒト	82	II	+	+
	16388 (2483)	ヒト	82	II	+	+
	I	ND	4	I	+	+
	2074	ND	36	II	+	-
C. lari	729	ND	31	I	+	-
C. coli	348	ND	14	I	+	-
C. spor- um subsp fecalis	5754	ND	NT	NT	+	-
C. fetus subsp. fetus	7055	ND	NT	NT	+	-
C. hyoini testinal is	8494	ヒト	NT	NT	+	-
C. jejuni subsp. doylei	9365	ND	NT	NT	+	-
A. butzle ri	13220	ヒト	7	IIIA	+	-
B. coli VT1+		ND	NT	NT	+	-

E.coli V72+	H19	ヒト	NT	NT	+	-

前述(25)に従い、各株の細菌学サンブル白金耳を取り、DNAを抽出した。PCR条件は、p-3Fとp-6Rを利用した35サイクル、アニーリング温度55℃の反応に使用するゲノムDNA量が50ngである以外は上記に同じである。次にPCR反応液に6×サンブル緩衝液を加え、それぞれ20μlをTAE緩衝液中に1%アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色した。各株は12ウェル型の細胞培養プレート(Costar)を用いた2層システムで細胞毒素の表現形発現についてもスクリーニングした。各株の白金耳をウシ胎児血清(FBS)を含まない最少必須培養液(MEM)2mlに接種し、ウェル底に存在する1mlのNeuTler-Hinton薬天の上に重層した。金を液体培地が無くなる48時間まで増殖させ、遠心分離して細菌を除去した。HEP-2細胞は毒素濾過に加える24時間前に、96ウェル型プレート、10%FBSが添加された200μlのMEM中に1×10<sup>4</sup>細胞/ウェルの密度で二次培養された。Hep-2細胞の二次培養に用いた増殖培地200μlを無菌の濾過液200μlと交換して、上清の細胞毒性活性についてアッセイした。細胞の細胞学的変化について48時間毎にスクリーニングした。細胞培養アッセイではE.coli O157:H7 3787(H19)株、バロ毒素1型陽性(VT1)と90-2380株、バロ毒素2型(VT2)陽性を陽性コントロールに、そして接種していない培地を陰性コントロールとして利用した。

ジーンバンク受付番号

結果

ベクター化PCR

NheIで消化し、対応する共通オリゴヌクレオチドと連結したゲノムDNAを用いてベクター化PCRを行い、DNA配列決定に好適なアンプリコンを得た。共通プライマー(UVP)とp-1F、p-2Fとp-3Fは同様の大きさのおおよそ800bpの長さを持ち、NheI制限酵素部位(図1)とプライマー部位(表1)を含むアンプリコンを生じた。3種類のアンプリコンのDNA配列決定からは、翻訳したときに細胞毒素のN-末端から得られる蛋白配列に相当するORFを含む同一配列が示された。PCR条件が維

持された時は、残りのゲノム消化体についてその他ののアンプリコンは認められなかった。DNA配列より、配列決定されたアンプリコンの核酸位置768ないし749からプライマーp-6Rが設計された。p-3Fに沿った新しいプライマーを引き続き利用して、細胞毒性porin遺伝子のサザンブロット解析と位置特定に利用する650bpのプローブを増幅した。

細胞毒性porin蛋白の部分クローニングと配列決定

ジコキシゲニン標識細胞毒性porinプローブを用いた消化したゲノムDNAのサザンブロット解析からは、6508Pプローブで釣ったときの数本の別々のバンドが生じた(図2)。SepI断片を選び、精製しpUCに連結し、Epicurian coli XL1-blueコンピメント細胞の形質転換に利用した。SpeI消化し、抽出したゲノムDNAからPCRで650bp産物が陽性であった1つのコロニーをGj08と命名し、配列を決定した。

650bpプローブを用いたサザンブロット解析の結果と、NheIベクター化ライブラリより最初に得たアンプリコンの制限酵素地図(図2)より、逆向きPCRはHindIII消化DNAについてだけ実施した。サザンブロットからは、ジコキシゲニン標識プローブと逆向き

PCRによる増幅の候補の1つであるおおよそ800bpの断片との間の反応は弱いことが示された。新しいプライマー、ベクター化PCRからの配列決定されたアンプリコンの5'-209→190-3'位置より作られた35p-7Rは、p-3Fと共に、連結されたHindIII消化ゲノムDNAを有する800bpの産物を産生した。配列を決定すると、アンプリコンには開始コドンとリボソーム結合部位を有する全リーダー配列を有するporin蛋白のN-末端が含まれていることが判明した。クローニングと逆向きPCRの配列データと翻訳蛋白を図3に示す。制限酵素地図は機能遺伝子の位置6にSpeI制限酵素部位があることを示しており、従ってSpeIクローニングだけが機能遺伝子を含んでいるが、遺伝子の残りは逆向きPCR反応産物のアンプリコンの配列より推測された。

全遺伝子は長さが1275bpであり[配列番号3]、porAと命名された。蛋白は424アミノ酸長をコードしていて(図3)[配列番号2]、分子量は45.6kDa、pIは

4.44と計算された。リーダー配列は長さ222アミノ酸残基で、-3、-1ルールに従い配列決定された蛋白の最初のアミノ酸であるAla→22(A)とThr→23(T)の間で活性型蛋白から切断される。リーダー配列を除いた成熟蛋白は分子量43.5kDa、pI4.35と計算された。これらの所見は、C.jejuniのporinアデノシンキナーゼ遺伝子をPCR増幅するため(図4)、ならびに配列決定反応への応用のためにブライマーp-15Fとp-16Rを設計した。

配列分析

配列の相同性の検索は、GCG(Genetics Computer Group, Madison, WI)を利用して全ORFと翻訳蛋白について行った。C.jejuni2483株の翻訳されたporin蛋白は、従来報告されていたC.jejuni porin

蛋白(3)とWolffella recta(20)の45kDaと51kDaの外膜蛋白以外、特徴付けられている何れの蛋白とも相同性はなかった。しかし、BLAST(BLAST; Beckman Center for Molecular and Genetics Medicine, Stanford University of Medicine)データベース検索によれば、DNA配列は短いストレッチャ全体がH.influenzae外膜蛋白P2と最大の類似性を有していた。C.jejuni 2483株と幾つかの細菌の外膜蛋白の翻訳porinを比較解析からは、C.jejuni porin蛋白はH.influenzaeの主要外膜蛋白P2と50%の配列類似性を有していたが、相同性は23%に過ぎないことが示された。さらに、相同性が最大となるDNA領域のなかでは、蛋白配列の同一性は72%であった。またC.jejuniのporinはEnterobacter Cloacaeの小孔形成外膜蛋白PhoEと類似性46%、同一性21%を有しており、Salmonella typhi ompCとは類似性43%、同一性17%、E.coli PhoEとは類似性42%、同一性19%を有していた。C.jejuniのporinをE.coliのompE、ompC、PhoEとLcと、そしてK.pneumoniaeのPhoEとS.typhiのompC(29)のアライメントから得たコンセンサス配列と比較すると、45%の類似性と20%の同一性が認められた。

porAと細胞毒産生のためのCampylobacter sp. のスクリーニング

細胞毒産生遺伝子の表現形質および遺伝形質発現に関するC.jejuniスクリーニングの結果を表2にまとめた。2相増殖システムの濾過体を組織培養でアッセイし

たところ、Campylobacter sp. と関連菌の32株全てが細胞毒性成分を産生していたが、porA特異的プライマー(p-3Fとp-6R)を用いたPCRで陽性であったのは32株中22株のみであった。しかし、porAについてスクリーニングしたC.jejuni20株中19株は650bp産物のPCR陽性であり、porin遺伝子はC.jejuni株間、特にLior血清型82で良く保存されているが、Campylobacterの

関連種では保存されていないことが示された。

考察

1275bpのORFは36.8mol%の%グアノシン+シトシン含有量を有しており(図3)、以前にC.jejuniの染色体DNAについて報告された範囲(42, 43)より若干高い値を示した。これまでに5'-ACGAG-3'の配列を持つ配列として報告されている(33)配列は、開始コドンATGの上流10bpに中心がある。これまで報告されている(33)配列は、5'-TTTACT-3'の配列を持つ開始コドンの上流87bpに中心を持ち、一方推定-10歳である5'-TTAAGA-3'は57bp上流に中心がある(図3)。-35および-10配列は共にPC/Geneソフウェアパッケージ(Intelligenetics, Inc.)とJ.jejuniの発表配列からの推定部位との比較分析より、推定部位と予想された。終止配列候補は停止コドン5'-TAA-3'から25bp下流に存在している(図5)。ここには5個の非対合塩基で断てられた、-19.2kcl/molの推定安定性を持つ9bpの2回ステムループを含んでおり、ループ構造を含むことができる。これに続いてポリA域があり、rfa独立終結配列を示している(1)。

少数の例外を除き、porAのコーディング域で用いられるコドンはGenebankより得られるものに一致している(下記表3)。

表3

C.jejuni2483株の1275bpのオープンリーディングフレームporAに関するコドン利

用表

UAA	-	Ile	AUC	0	Arg	CGU	1
UAG	-		AUA	2		AGA	7

物が高温耐性であることから、これらは高い温度に於ける遺伝子の安定性を増しているのだろう。

ORF [配列番号3] はpIが4.44の45.6kDaの蛋白を生ずることが判明しており、これは従来のC.jejuni porin蛋白に関する報告(3, 18, 21)に一致している。翻訳された蛋白はまた、NovotnyとAuffrayの方法(31)(PC/Gene)により決定された如く複数の疎水性領域を含んでいた。Garrier(12)(PC/Gene)とNovotny(31)の方法を利用した構造予測からは、アミノ酸の50%が拡張した、またはβ-折りたたみシート構造を形成するporinに関連した重要な二次構造があることも示された。これは、これまでにX線光二色性(CD)の所見(3)ならびにその他の細菌のporin蛋白の所見(29)に一致する。膜を跨ぐRhodobacter capsulatus porinの場合で6ないし17残基長と推定されている(35)。この仮定に即り、β折りたたみシートダイアグラムと疎水性チャートを検討に入ると、腸内細菌共通配列(29)とR.capsulatusでは共に8個のβ鎖を含んでいる(29)のに対して、12個の膜スパンニングドメインがあると考えられる。

同一配列の相対量は、類似配列に比べると低い。このことは、一次構造は非常に異なるものであるが、424アミノ酸蛋白に関連する性質は他の性質が良く分かっているporinと似ていることを示している。例えば、塩基性、極性と酸性残基の相対量はH.influenzae P2ならびに腸内細菌共通配列に似ているが、しかし、C.jejuniのporinでは疎水性残基の割合はより大きい(表4)。

表4

C.jejuni 2483株のporA、H.influenzae P2ならびに腸内細菌のporin共通配列の7ミノ酸組成比較。カッコ内の数はリダー配列の残基数を示す。

	UGA	—		AUU	4		CGC	1
Ala	GCU	35	Lys	AAA	22		CGA	0
	GCC	1		AAG	0		AGG	0
	GGG	1	Leu	CUU	17		CGG	0
	GCA	11		CUA	4	Ser	UCA	6
Cys	UGU	0		CUG	0		UCC	0
	UGC	0		UUG	0		UCG	0
Asp	GAU	30		UUA	17		UCU	6
	GAC	2		CUC	0		AGC	7
Glu	GAG	2	Met	AUG	2		AGU	6
	GAA	15	Asn	AAC	19	Thr	ACG	1
Phe	UUU	10		AAU	15		ACC	0
Gly	GGC	3	Pro	CCC	0		ACU	14
	GGA	9		CCU	1		ACA	14
	GGG	0		CCA	3	Val	GUC	1
	GGU	32		CCG	0		GUG	2
His	CAC	2	Gln	CAG	2		GUU	12
	CAU	2		CAA	13		GUA	20
Trp	UGG	5						
Tyr	UAC	11						
	UAU	12						

例えば、TyrはUAUとUACにより等しくコードされているが、GUAはGUUより頻繁にValをコードするのに利用され、そしてAUCはAUUに代わってIleをコードする。最も大きな違いは、UUCによりコードされるPheの数であり、これまではUUUにコードされる頻度

の方がより高く、一方AsnはAAUよりもAACでコードされていることが示された。これらの頻度はコーディング領域内のGC残基量によると考えられ、これら生

アミノ酸 群	残基数/mol		
	C. jejuni porA	IL influenza p2 <sup>a</sup>	共通腸内細菌 porin <sup>b</sup>
塩基性			
Lys	22 (2)	30 (2)	23
Arg	9	16	11
His	4	7	1
酸性			
Asp	32	17	34
Glu	17	24	17
中性			
Asn	34 (1)	25 (1)	24
Cys	0	0	0
Gln	15	14	17
Gly	44 (1)	40 (1)	40
Ser	25 (2)	17 (1)	18
Thy	29	24 (1)	22
Tyr	23	23	23
疎水性			

Ala	48 (8)	24 (8)	26
Ile	15	15 (1)	9
Leu	38 (4)	24 (2)	23
Met	2 (1)	1 (1)	5
Phe	23 (1)	13 (1)	21
Pro	4	3	4
Trp	5	0	3
Val	35 (2)	24 (1)	15

<sup>a</sup>Hansenら (17)からのデータ

<sup>b</sup>H.Nikaido(29)からのデータ

これはより広い二次構造に至るメンブレン域がより広範囲にまたがることに一致している。C.jejuni porin配列を腸内細菌の共通配列の理論的読み込みパターンと比較した場合には、共通配列の膜領域を除いた残りの部分に比べて共通配列に有意な類似性は認められなかった。H.pyloriのporin蛋白のN-末端配列との比較からは (9, 10)、C.jejuniのporinとの配列同一性は極めて小さいことが示された。しかし、この配列を類似性について比較すると、C.jejuniのporinはHopC(57%)が最も高い類似性を持っており、ついでHopE(55%)、HopDとHopB(50%)、そしてHopA(47%)との類似性が最も低かった。J.pylori porinにより形成されるチャネルの伝導度レベルは0.25ないし0.36nSの範囲であり(10)、これはC.jejuni porinについて報告されている8.82(18)に比べて明瞭に低い。H.pylori porinそれぞれその分子量はC.jejuniのporinより大きく、またC.jejuni porin同様に3量体の形をしているものの、脂質二重層内では単量体として存在すると考えられている(3)。

MMMPはヒト(30)やウサギ(11)の両方で免疫反応を惹起することが

知られており、ワクチン開発に好適候補とされる。その他のC.jejuni株のporin遺伝子の頻度を決めるPCR試験からはCampylobacterspとその関連細菌がPCR陰性であったのに対して、これらの株の95%が、全てが無傷の遺伝子にないし少し

なくともその一部を含んでいることが示された。これまでの報告では、C.jejuni 85H株(21)のMOMPに対する抗血清を利用したSDS-PAGEとウエスタンブロットにより決められ大きさと同様の大きさの蛋白を有する病原性株は60%だけがであった。上記のPCRの結果は意味深く、そして他のCampylobacter spからC.jejuniを特定する新しい効果的な方法を提示する。porin蛋白を利用した組換えワクチンの開発の可能性もまた重要である。Gonzalesら(13)のこれまでの研究は、S.typhiのporinによるリンフォカインの誘導を通してT細胞の活性化が起こり、その結果として予防免疫として機能するらしいことを示している。腸内細菌外膜蛋白RhoEを、E.coli表面にB細胞エピトープが発現し生ワクチン開発用のビークルを提供するベクターとして利用することで、モルモットにおいて予防が認められた(45)。

実施例2・

材料と方法

細菌株と培地

C.jejuni2483株を胃炎患者から単離し、Lior血清型82、バイオタイプ1、Peinner血清型0:11と特徴付けした。患者から分離後、この菌を5%ヒツジ血液を含むトリプシン処理したダイズ寒天(TSA)に2回継代し、5%ヒツジ血液を含むトリプシン処理ダイズブロス内に-70℃に保存した。一部を溶解したものを、前もって5%O<sub>2</sub>、10%CO<sub>2</sub>と85%N<sub>2</sub>を含む大気と平衡化しておいたBruce11aブロス(BBL, Cockeysville, MD, USA)に接種する前に5%ヒツジ血液を含むTSA

上で培養した。パッチ調整のために、菌懸濁液2をMcFarland標準8の密度に調整して、2ml/Lの密度でBruce11aブロス4Lに接種した。接種したブロスをガス混合体中固定条件下に48時間、37℃で培養した。

細胞毒素複合体の単離

細菌を12,000×g、20分、4℃で遠心分離して集め、細菌を含まない濾過液4LをYM30メンブレン(30,000NMWL)を用いた攪拌細胞装置 (Amicon, Beverly, MA, USA) を利用し、4℃で超遠心分離し濃縮した。濾過体をまず限外濾過によりおよそ40倍に濃縮し、さらに硫酸を80%まで4℃で飽和させて濃縮した。硫酸で沈殿

した蛋白を12,000×g、30分の遠心分離により集め、50mlのTris-HCl緩衝液、pH7.0に再懸濁した。細胞毒性蛋白の精製は、ダイオードアレー検出器を装着した Hewlett Packard 1050シリーズの高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)を利用して行った。精製は全ベッド容量の1%の濾過体をHiLoad™16/60Superdex™75分子篩カラム(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)にかけて開始し、リン酸緩衝生理食塩水、pH7.0(PBS)、流速1ml/分で溶出した。分画をG15onアフラクションコクターで採取し、各50μlについてHEP-2、HeLaとCHO細胞を利用して細胞毒性活性を調べた。未変性の細胞毒性複合体の分子量は、PBS中に溶解した低分子量標準物質(Pharmacia Biotech)を利用してカラムをキャリブレーションし、決定した。細胞毒性含有分画を集め、Cetraprep-30ユニット(Amicon)を利用して濃縮し、7.5×75mmのTSK DEAE-5PWカラム(Pharmacia Biotech)にかけた。蛋白を0.2-0.25MのNaClの50mMTris-HCl液、pH7.0の直線勾配、流速1ml/分で溶出した。分画を集め、Cetnri-con-30ユニット(Amicon)で脱塩し、各サンプル50μlをHEP-2、HeLaおよびCHO細胞の単層に作用

し、細胞毒性を調べた。

濾過体から除いた細菌沈査を氷上において、Bronson Sonifier450™ソニケーター(Bronson Ultrasonic Corporation, Danbury, CT)、12,000kgで10分間遠心分離し、上清を濾過体と同様の方法でアッセイした。

ポリメラゼチェーンリアクション

ゲノムDNAをC.jejuni2483株から標準的は方法(70)で単離した。ポリメラゼチェーンリアクション(PCR)は既報(71)に従い、ゲノムDNA50ngをE.coliβプロテソV11aプライマー(GAAGAGTCGTCGGCAATTACG) [配列番号24] とVT1b(ACCGATCGACTATTATA) [配列番号25] とVT2a(ATTACCAACCCACGGCAGCT) [配列番号26] とVT2b(GCTCTGATGCATCTCTCGT) [配列番号27] と共に、アニーリング温度を42℃、45℃と50℃として実施した。またPCRはHelicobacter pylori cagAに特異的なプライマーDZ3(AGTAGGAGAACATGA) [配列番号28] とR009(AATAGCCTTAGAGTCTTTTTCGATCC) [配列番号29] とH.pylori vacA遺伝子に特異的なプライマーF6(GCTCTCTTACCA CCAATCC) [配列番号30] とR20(CTCTCAGGTTGTTACCATG) [配列番号31] を利用し



既報(72)に従い実施した。H.pylori Penner参照血清型05と06をそれぞれ、cagAとvacAに対するPCR反応の陽性標準体とした。利用したPCR法は、95℃1分、58℃1分と72℃2分を35サイクルして最後に10分間の伸長を行うvacA増幅に染色体DNA100ng/反応を使用した以外はcagA(72)について報告されたものに同じであった。PCR反応産物はTris-酢酸塩、EDTA含有緩衝液(pH8.3)中に1%アガロースゲル上で電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色してトランスイルミネーター上(Ultra-violet Products, Inc, San Gabriel, CA, USA)で観察した。

#### 細胞毒性活性と蛋白測定

単離作業中の各ステージに於ける蛋白量はBCA蛋白アッセイを利用して測定した(Pierce, Rockford, IL, USA)。HEp-2, HeLaおよびCHO細胞はT-75細胞培養フラスコ(Costar, Cambridge, MA)中に、10%のウシ胎児血清(Sigma, St.Louis, MO, USA)を添加したEagleの最少必須培地(MEM)で増殖させた。細胞は細胞毒性活性を測定する24時間前に96ウェル型プレート内に入れて二次培養した。細胞毒性活性を既報(54)に従い3細胞株について定量し、活性は48時間培養後に組織培養用量50(TCD<sub>50</sub>)として表した。TCD<sub>50</sub>は細胞の50%に細胞毒性変化を生じさせるのに必要な毒量の量と定義された。細胞培養体を無水メタノールで10分間固定し、Giemsa™(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)で30分間染色した。特異活性を単離の各ステップで測定し、TCD<sub>50</sub>/μg蛋白で表した。E.coli 0157:H7株LDC3787(H19)、VT1陽性と株LDC90-2380、VT2陽性を、HEp-2とHeLa細胞のTCD<sub>50</sub>の測定のコントロールに利用した。V.cholerae01、株755、エンテロトキシン産生分離株をCHO細胞アッセイのコントロールに利用した。

#### 細胞毒性複合体の分子量和物理的特性

単離した細胞毒性物質1μgをβメルカプトエタノールとナトリウムドデシルスルフェートを含む等量の2×サンブル緩衝液と混合した。サンブルを5分間煮沸し、12%の均一ゲルによるナトリウムドデシルスルフェートポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)に低分子スタンダードと共にかけて、市販キット(Biorad, Hercules, CA, USA)を利用して銀染色した。単離した細胞毒性物質1μgを70℃で30分間加熱するか、PBS中に0.003から1.25%のトリプシンで、2時間、

37℃で処理した。残存トリプシン活性はFBSを最終

濃度が20%になるように加え、1時間、37℃で加熱して不活性化した。細胞培養アッセイにより処理後の残存活性を測定する前に、加熱しトリプシン処理したサンブルをPBSによる2倍希釈系列を調整した。加熱により不活性化したトリプシンとFBS単独を陰性コントロールとして利用した。

#### 細胞毒素N-末端の配列決定

細胞毒素成分を単離し、SDSとβメルカプトエタノールで変性し、12%SDS-PAGE上に各種前染色分子重量スタンダードと共に電気泳動した。泳動後、蛋白とスタンダードを電気泳動的にボリ2フッ素ビニルイデン(PVDF)(BioRad)に18時間、100mA、10%エタノールを含む10mMの3-[(シクロヘキシルアミノ)-1-プロピル]ホスルフォニック酸(CAPS)(Sigma)緩衝液中、pH11.0で転写した。転写後、プロットを0.1%のクマシーブルーR-250(BioRad)の50%メタノール液で5分間染色し、50%メタノール、10%酢酸液で脱色した。固定された細胞毒素蛋白をPVDFから切り出し、Edman分解しApplied Biosystemsモデル473A蛋白シーケンサーにかけ配列決定した(GIUL Research Center, Saint-Foy, Quebec, Canada)。蛋白分SERP-1根器はLasergene(DNAStar, Madison, WI, USA)を利用して行った。

#### 中和とウエスタンブロット分析

中和試験は1μgの単離複合体の一部につて、C.jejuniの細胞毒性複合体ならびにE.coli VT1, E.coli VT2, C.jejuniのCDT(54)やE.coliのCDT(54)、V.choleraeのエンテロトキシン(Sigma)やC.difficileの細胞毒素(Techlab, Blacksburg, VA, USA)に対して作成したポリクロナル抗体を利用し行った。正常ウサギ血清を陰性コントロールに使用した。同種抗血清は、単離した細胞毒性物質を0.

5mlのフレンド不完全アジュバント(FIA)に乳化した調整体5μg/mlを0.5mlNew Zealand白色ウサギの筋肉内に接種し作成した。さらに同一抗原のFIA調整体を1週おきに4週間皮下注射した。各抗血清の1:10希釈体を単離蛋白1μgの2倍希釈系列に加えた。1時間、37℃の反応させた後、各サンブルの一部をHEp-2細胞に加えて、48時間、37℃で反応した。各抗血清はウエスタンブロットでも解析し

た。C.jejuni細胞毒性複合体、E.coli VT1とVT2、C.jejuniのCDTやE.coliのCDT、C.difficileの細胞毒素とV.choleraのエンテロトキシンはそれぞれSDS-PAGEゲルで各種前染色分子用量スタンダード(BioRad)と一緒に分離してから0.2μmのポアサイズ位のPVDFメンブレンに18時間、100mAで転写した。メンブレンを5%スキムミルクで1時間洗浄して抗体の非特異結合を防止し、それから5分間づつPBSで3回洗浄した。抗血清は0.05%のTween<sup>TM</sup>-20を含む1%スキムミルク液で1:500に希釈し調整し、メンブレンに2時間、室温で加えた。続いて200mU/mlのヤギ抗ウサギア抗リフォスファターゼ標識抗体(Boehringer Mannheim, Laval, Quebec, Canada)と室温で1時間反応させた。5-プロペー4-クロロ-3-インドリル-リン酸(BCLIP)とニトロブルーテトラゾリウム(NBT)(Boehringer Mannheim)を利用して発色させた。

C.jejuni2483株、C.jejuni LDC 3969、C.jejuni LDC 16336、C.coli 8682株、Aeromonas veronii LDC A2297 (陰性コントロール)とE.coli 3783(VTL)の陽性コントロール)より得た粗濃縮濾過体を利用してウエスタンブロット分析も行った。各粗濾過体を合計40μg電気泳動し、前記同様にしてPVDFに転写し、抗C.jejuni細胞毒性複合体と反応させた。さらに各濾過体について、48時間培養後のHEp-2細胞内での細胞毒性活性を試験した。

炭水化物の特徴

合計2μgの単離した細胞毒性物質について、リボポリサッカライドが存在するかリムルスアメーバ細胞溶解(LAL)試験を能書に従って行った(Pyrote11, Associates of Cape Cod, Inc., MA, USA)。E.coli LPSの毒性物質は発熱物質を含まない水で10倍希釈2系列を作成し、各希釈液100μlをPyrote11<sup>TM</sup>と37℃の水槽中に1時間反応させた。チューブを転倒し、固形の凝固塊を含むチューブを陽性と考えた。リボポリサッカライドが毒素の活性に関与するか決めるために、単離した細胞毒性物質1μgを1時間、37℃で50のニューロミナーゼ(Sigma)、pH5.0と、30のN-グリコシダーゼF(Boehringer Mannheim)とpH7.2と10mMメタニコンド酸ナトリウム(Sigma)と90分間、室温で反応させた。それから残存細胞毒性活性を2倍希釈系列を用いて、Bhp-2とHeLa細胞で調べた。

炭水化物化合物の同定は、5種類の特異的ジコキシゲニン標識レクチンを含む(表5)グリカン分別キット(Boehringer Mannheim)を利用して行った。およそ1μgの単離した細胞毒性蛋白と5μgの各炭水化物鎖をPBDFメンブレン上にスポットし、37℃で一晩乾燥させた。メーカーの能書の指示に従い共精製したLPSについてメンブレンにブロープを作用させた。陽性結果を示したレクチンは、各炭水化物鎖15μgと精製調整物の試験炭水化物8μgを利用してウエスタンブロットし、解析した。3つの別々のパッチからの単離細胞毒性物質について、490nmを測定するフェノールー-硫酸アッセイを利用して炭水化物濃度をμg単位に調べた(73)。この結果は精製炭水化物μg当たり精製炭水化物μgの数値比として表された。10μgの炭水化物とゲルを利用したSDS-PAGEと未変性PAGEを行い、まず過ヨード酸-シッフ(PAS)染色(74)し、次にCoomassie青で染色する二重染色を行った。

表 5

炭水化物測定に利用したレクチンの特異性と相互作用

レクチン	特異性 (結合)	反応性
Galanthus nivalis agglutinin(GNA)	Mnaα(1-3), α(1-6)又はα(1-2)-Man (末端結合マノース)	+++
Maackia amurensis agglutinin(MAA)	Neu5Acα(2-3)-Gal (ガラクトースにシアル酸が末端結合α(2-3))	+
Datura stramonium agglutinin(DSA)	Galβ(1-4)GlcNac(ガラクトースβ(1-4)-N-アセチルグルコサミン)	+
Arachis hypogaea peanut agglutinin(PNA)	Galβ(1-3)GlcNac(ガラクトースβ(1-3)-N-アセチルグルコサミン)	-
Sambucus nigra agglutinin (SNA)	Neu5Acα(2-6)-Gal又はGalNac (ガラクトースまたはN-アセチルガラクトサミンに末端α(2-6)結合したシアル酸)	-

\* +++ 強陽性結果；+ 弱陽性結果；- 陰性結果

結果

細胞毒性複合体の同定と分子特性

細胞毒性複合体により誘導される中毒の細胞学的徴候には、正常的作用を受けていない細胞に比べたHep-2細胞の細胞質内での液胞形成が含まれる。各細胞内の液胞の数は1ないし5で、影響を受けた細胞の中には細胞質の50%以上が液胞になるものがある。24時間後、液胞は小さく、細胞の形は丸くなり光を強く屈折する様になる。48時間までに、細胞質は水疱化し、核は凝縮して細胞が単層から消失する様になる（図1cと写真）。毒性は用量依存的で単離した物質の2倍希釈を利用して検出される。1μg蛋白/ウエルの低細胞毒素濃度では、円形化は72時間に発生したのに対し液胞は48時間持続した。10μg蛋白/ウエルのより高い細胞毒素濃度を用いると、中毒後12時間で液胞が形成されて消失し、その後24時間で細胞

の50%以上が円形化と高屈折化する。48時間で細胞の80-100%が円形化した（図6c）。細菌細胞の超音波破砕体についてその細胞毒性を調べたところ、同様の細胞学的変化が全ての細胞株に観察された。2483株は粗濃度で低レベルのCDTを生じた。しかし、これはC.jejuniまたはE.coli CDTに対するポリクロール抗血清で中佐された（データ未提示）。

細菌の増殖が定常期になった時に、細菌をBrucellaプロセスで48時間、37℃で増殖した。高レベルの細胞毒性活性を持つ培養上清から濃縮された蛋白は、G75カラムからは100kDa以上の分子量を持つと計算されるポイドポリユーム分画に溶出されることが判明した（図7a）。このピーク（ピークA）を集めて、TSK DEAE-5PWカラムにかけた。TSK DEAE-5PW分画の細胞毒性活性はおよそ0.21-0.22M NaClに毒素が溶出されることを示していた（図7b）。この2カラム精製法により、変性条件下のRfより分子量45kDaと計算された銀染色で1本の蛋白が得られた。精製工程の各段階の毒性活性を表6に示す。単離した細胞毒性複合体は、Hep-2に對し最も強い毒性を示し、CHO細胞に對し最も弱い毒性を示した。細胞毒素は70℃、30分の熱処理により不活性化されたが、試験した濃度のトリプシン処理に對して耐性であった。

表 6

Hep-2、HeLaとCHO細胞に於ける、TCD<sub>50</sub>/μg蛋白で表した各精製ステップの比活性

毒素調本	Ilep-2	HeLa	細胞培養 比活性 CIO
C. jejuni2483株 粗濃縮体	1. 5 6	0. 5 1	0. 5 1
Superdex 75 10/60	1. 6 1	3. 8 8	0. 9 7
TSK DEAE-5PW	2 0. 1	7. 4 9	1. 8 7
E. coli VT1-LCT C3787(1119) 株	0. 3 5	0. 1 7	NA
E. coli VT2-LCT 90-2380株	1. 4 8	2. 8 9	NA
V. cholerae ol. 755 株	NA	NA	0. 4 8

\* TCD<sub>50</sub>/蛋白μg:NA=活性無し

ポリメラゼチエンリンアクリン

E.coli VT1とVT2特異的オリゴスクレオチドブライマーは、成熟型ペロ毒素1型と2型のA-ならびにB-サブユニットに対応するアンブリコンを産生できなかった。同様に、H.pyloriのcagAとvacA遺伝子特異的ブライマーもアンブリコンを産生できなかった。

蛋白アラインメント

細胞毒性蛋白は分子量45kDaと計算される単一蛋白より成る。切り出したバンドを用いてN-末端の配列を決定し、合計31アミノ酸残基を得た（表7）。蛋白は数個の疎水性の電荷を持った残基を含み、等電点は4.35と推測された。蛋白はporinとして特徴付けられている(68)C.jejuniの主要外膜蛋白(MOMP)と97%の相同性を有し、残基30の1アミノ酸の違いが保存されていた。細胞毒性porinも

Wolinetia rectaの45kDaと51kDaの外膜蛋白とそれぞれ56%と63%の相同性を有していた（75）。

表 7

BLAST<sup>†</sup> 検索により確認されたC.jejuni2483

細胞毒性 porin と関連配列の配列相同性

蛋白	配列
C. jejuni 細胞毒性 porin 蛋白	TPLEEA IKQVDVSGVIRYRYDTGNFDKNVYN
C. jejuni MOMP ; porin 蛋白	TPLEEA IKQVDVSGVIRYRYDTGNFDKNF4N
W. recta 45kDa 外膜蛋白	TPLEEA IKQVD SG---XY-+---X-N-
W. recta 51kDa 外膜蛋白	TPLEEA IKQVD+SG---XXY+-----KN-

<sup>1</sup> Beckman Center for Molecular and Genetics Medicine, Stanford University School of Medicine

2. 大文字は同一残基を示す；“\*”は保存的変更を表す；“-”は配列のミスマッチを表す；“X”は未知残基を表す。

中和とウエスタングロット分析

E. coli VTL と VTZ、C. jejuni と E. coli CDT、V. cholerae エンテロキシンと C. difficile 細胞毒素に対するポリクローナル抗血清は、細胞培養中の C. jejuni 毒性複合体により惹起された細胞毒性作用を中和できなかった。しかし、この細胞毒性複合体を連続希釈して、細胞毒性蛋白に対して作成したウサギポリクローナル抗体と反応し、HEP-2 細胞に加えると、1:2 希釈で  $TC_{50}$  が認められたのに対し、正常ウサギ血清では 1:32 であった。中和は中毒後 24 時間の  $TC_{50}$  の減少として定義された。細胞毒性蛋白に対する抗血清は、精製された 45kDa 細胞毒性蛋白によるウエスタングロットにおいて免疫反応性を示した。その他の毒素に対する抗血清はイムノブロット分析において細胞毒素または炭水化物に対して交叉反応性を示さなかった。各種 *Campylobacter* 細胞毒性株の粗濃縮濾過体のウエスタ

ングロットは、porin と同様の分子量を持つ蛋白の存在を示したが（図 8）、接種しなかったブロス、A. veronii と E. coli VTI 株の濾過体のブロットにはバンドは認められなかった。

リボポリサッカライドの同定と炭水化物の分析

リムルスアメーバ細胞溶解体と連続希釈体を 1 時間、37℃ で反応し、単離した細胞毒性物質と E. coli LPS についてエンドキシンの有無をアッセイした。細胞毒性物質は 1:128,000 希釈に於いて強い陽性結果を示し、単離された細胞毒性物

質が LPS を含んでいることを示した。E. coli の LPS もまた陽性結果を示した。細胞毒性活性が蛋白成分中に存在する複合体に関連したものか決めるために、複合体を 10ml のメタケイソン酸ナトリウムと反応させ、含有ヘキソース上にある遊離型ヒドロキシ基を酸化し、50μ のニユーロミニダーゼによりシリアル酸残基を切断し、30μ の N-グリコシダーゼでアスパラギン結合 N-グリカン を切断した。それから複合体の HEP-2 と HeLa 細胞に於ける細胞毒性活性についてアッセイし、 $TC_{50}$  のエンドポイントとして表した。HEP-2 細胞での力価は 32 であったのに対して、HeLa 細胞に於ける力価は 8 であり、未処置毒素を接種したコントロール細胞に同じであった。

LPS の炭水化物成分の特徴をジギゲニン標識レクチン（表 5）を利用して調べた結果、データからは異なるサブユニットの複合体が示された。レクチン Galanthus nivalis 凝集素 (GNA) は精製物質と強く反応し、末端に結合したマンノースの割合が高いことを示唆した。レクチン Maackia amurensis 凝集素 (MAA) と Datara stramonium 凝集素 (DSA) もまた陽性であったが、より弱い結果を示し、シアル酸が末端に結合した  $\alpha$  (2-3) ガラクトースとガラクトース- $\beta$  (1-4) -N-アセチルグルコサミンの複合体、ならびにハ

イブリッド N-グリカン構造体の存在を示唆した。残りのレクチンは炭水化物複合体に関しては反応性を示さなかった。精製物質に於ける蛋白に対する炭水化物の割合は 4:1 と計算された。PAS 染色からは、複合体の蛋白成分の様な複数のバンドではない単一の高分子炭水化物が示されたが、その大きさは広範囲に広がっていた（図 9）。ゲル電気泳動前に変性緩衝液中に煮沸したサンプルとは異なり、未変性 PAGE ゲル中の精製細胞毒素を二重染色しても蛋白成分は認められなかった（図 9）。レクチンを利用したウエスタングロット（図 10）からは、PAS 染色により高分子スミアーとして認められる炭水化物が GNA に対して高い活性を示した（図 10）。

考察

熱耐性、トリプシン感受性で特徴的な HEP-2、HeLa ならびに MRC-5 細胞の球形化を招く C. jejuni 株の細胞毒素は Yeen らによりまず報告された (76)。Guerrant ら (

58)もまた、60℃で熱安定で、0.25%トリプシンに部分的に感受性な分子量が14kD以上の細胞毒性成分を報告している。これら研究者により同定された細胞毒性成分は*E.coli*のペロ毒素または*C.difficile*毒素に対して作成された抗血清では中和されなかった(58)。その後の報告は、成熟型Shiga-毒素のBサブユニットに対するモノクローナル抗体で中和できる*C.jejuni*由来のShiga細胞毒素が存在することが示された。しかし、これら研究者はまた、同一モノクローナル抗体では中和できない毒素も検出していた(77)。さらに、Guerrantと共同研究者(58)は、Yeenら(76)と異なり、超音波処理された全細菌細胞膜中に細胞毒性活性を認めた。本研究では、細胞毒性活性は*C.jejuni* 2483株の全細菌細胞の培養体と超音波処理した濾過体の両方に検出された。

porinとLPSを含む細胞毒性複合体が分離されて、特徴が調べら

れた。これまでの研究は細胞毒性因子が*C.jejuni*からの富LPS分画に存在することを示していた(60)。しかし、毒性に於けるLPSの果たす役割については不明であった。Misawaら(78)は、その細胞毒性の発現が*C.jejuni*をBrucellaブロス内で増殖させると上昇することを発見した。しかし、これら研究者の発見に対して、本研究ではHep-2細胞が細胞毒性複合体に対し最も高い感受性を示すこと、そしてこれら活性がFBSが添加された培地中で細胞培養が増殖されたか否かにかかわらず常に高いことを決定した(78)。異なる細胞株に認められた活性増加はporin-LPS複合体の結合に必要なレセプターの相対量に拠るのだろう。これまでの報告からは、*C.jejuni*の上皮細胞ならびに腸粘膜への付着にLPSを関連付けており、またこの工程が過ヨウ素酸酸化により阻害できることが示されている(49)。porin-LPSの細胞毒性活性はHep-2やHela細胞では過ヨウ素酸処理後も維持されていることから、毒性複合体の付着がLPS以外の成分により促進されていると考えられた。porin蛋白の発現が宿主細胞への細菌の結合に関与していないことを示し、Fauchereら(79)は、MOMPがHela細胞への付着に関与していないことを示している。これらの研究より、LPSは宿主細胞への細菌の付着を仲介するが(49)、porin成分は細胞毒性複合体に結合すると考えられる。

細胞毒性porinの作用様式は未だに不明であるが、それにより誘導される形態

変化は他の良く研究されている細菌性細胞毒素のものと性質が類似している。中毒の初期段階では、細胞毒性porinはHep-2とHela細胞に液胞形成を誘導したが、これはH.pylori液胞化毒素に対する反応の結果と外観は類似している(80)。今回、*C.jejuni*細胞毒素による中毒後に液胞化が認められたが、cagAとvacA遺伝子に対する特異プライマーを利用してPCR産物は得られなかったことから(72)、*C.jejuni*のporinによる液胞化誘導をコードしている

遺伝子はH.pyloriに存在し発現している遺伝子とは異なることが示唆された。

*C.jejuni*細胞毒性porinによる宿主細胞の中毒が24時間を越える場合、液胞は退行するが、ペロ毒素やジフテリア毒素に特徴的な細胞質の空胞化や核の凝縮がより顕著になる。ペロ毒素やジフテリア毒素は蛋白合成に干渉して、プロテアソーム化された死またはアポトーシスを誘導することが知られている(81, 82)。PCRに基づくペロ毒素特異プライマーを用いた*C.jejuni*のスクリーニングは陰性であり、Mooreら(77)の低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション実験の結果を確認したことから、*C.jejuni*の細胞毒素複合体はペロ毒素とは別のものであることが示唆された。*C.jejuni*のporinがStaphylococcus aureusの $\alpha$ -毒素と同様の様式(82)にて細胞膜に孔を開けることも可能である。最近、Salmonella Typhimuriumのporinが細胞毒作用を示すことから、porinがHep-2細胞の細胞骨格と膜の超微細構造に直接作用することが示唆された(83)。さらに、Neisseria sp.のporinもまあ好中球に於いてアクチンの重合を阻害することが示されているが(84)、S.Typhimuriumのporinは炎症反応(85)とヒト単核細胞とリンパ細胞からのサイトカイン放出(86)の両方を誘導することが示されている。

等電点フォーカシング(IEF)ゲルのクマシー青染色と、複合体に対する抗血清を利用したウエスタンブロットによるブロービニングによる細胞毒性porinの等電点を決める試みは不成功であったクロマトグラフィーカラムとポリバッドファクター4 (Pharmacia Biotech)を利用した細胞毒性porin蛋白の単離は、おそらくLPSの干渉が原因で再現することが困難であった。この単離ブロットはまた、これまで細胞毒素を産生することが報告されている*C.jejuni* 3969株(59, 78, 87)の無細胞濾過体についても行った。この株が産生し

した細胞毒性活性は低かったが、Hep-2細胞では同様の形態変化が認められ、同様の大きさの蛋白がSDS-PAGEで観察された。同様の分子量の蛋白はその他のCampylobacter sp.の細胞毒性株由来の粗濃縮濾過体にも存在しており、porin-LPS複合体の放出がC.jejuni2483株だけに特徴的なものでは無いことが示されている。C.jejuni3969株より単離された細胞毒性産物中には炭水化物も存在している。この株は使用可能なLior抗血清では型判定不能であるが、バイオタイプ1型で、Pe mer血清型0:50であることが証明されている。porin-LPS複合体の放出が細胞死の間に枯発に起こるらしいこと、あるいは細菌が枯発に複製している時に消失するらしいことから、3969株（低毒素活性）と2483株（高毒素活性）の細胞毒性活性の違いは増殖速度依存の現象であろう。従って、増殖速度が速い株はより多くの複合体を産生するだろう(88)。最近、H.pyloriにより産生されるものに似た液体化細胞毒素が、病原性のジフテリア菌が同定されていないジフテリア感染小児の便中から検出された(89)。宿主細胞での液胞形成を誘導できる細菌は多いが、このプロセスは死細胞または死につつある細胞から放出されたporinを介するものだろう(88)。

レクチン研究からは、porinと一緒に精製されるLPSの炭水化物部分が末端に結合したマンノースと、ハイブリッドN-グリカン構造と複合体を形成する $\alpha$ (2-3)ガラクトースとガラクトース- $\beta$ (1-4)-N-アセチルグルコサミンと末端結合したシアル酸を有することが示された。温度安定性の菌体(O)抗原に換れば、本研究に使用したC.jejuni株は0:11型である。レクチンMAAが陽性結果であったことから、この株が血清型0:19に関連することが示唆された(90)。C.jejuniの0:19血清型株のLPSは $C_{61}$ と $C_{613}$ ガングリオシド上と感染後神経症と関連する0:19のその他の株に存在する

コア構造に似たコア構造を有している(91)。単離した複合体をメタノール素酸ナトリウム、ノイラミニダーゼとN-グリコシダーゼFで処理しても、複合体による毒性には影響しなかったことから、LPSが細胞毒性活性の内部成分ではないが、保護的な役割を果たしていることが示唆された。さらに、これがトリプシンによる酵素分解により干渉される可能性があり、これがこれまでの報告のトリプ

シン不活性化の不一致を説明するものかもしれない。未変性条件下では、LPSはporinと複合体を形成し、クマシー青による染色から保護するのだろう。細胞毒性蛋白は、SDS-PAGEにかける前にSDSと $\beta$ メルカプトエタノールを含むサンブル緩衝液中で煮沸したときだけ、クマシー青または銀染色で出現してくる。C.jejuni由来のporinは3量体porinファミリーに属することから、細胞毒性複合体の蛋白成分を解離するために熱変性が必要であるとは考えられない(63)。

細胞毒性porinの特徴がより完璧に理解され、コードしている遺伝子がクロニン化されて配列決定されれば、カンピロバクテリア症に於けるporinの役割をより深く理解できるだろう。この最も詳細は、porin-LPS複合体の細菌またはその毒素を検出するための診断法、そしてCampylobacter病の予防と治療のための組換えワクチンとしての潜在的な役割を示唆するだろう。

#### 実施例3・

C.jejuniの23株と関連細菌9株を対象に、C.jejuni2483株由来のporin遺伝子配列特異的プライマーを利用し、細胞毒素の表現形発現とporAの存在についてスクリーニングした。結果は下記表8に示す。

表 8

細菌	LCDC	採取元	Lior 血清型	バイオタイプ	毒素 陽性	PCR 陽性
C. jejuni	3454	ヒト	4	I a	+	+
	3969	NA	判定不能	I	+	+
	4951	ヒト	7	I	+	+
	4966	ヒト	7	I	+	+
	6847	ヒト	1	I a	+	+
	7099	鶏	6 1		+	+
	8916	水	9	I I	+	+
	8916	ヒト	9 4	I I a	+	+
	9214	ヒト	2	I a	+	+
	9541	水	8 2	I I	+	+
	9543	水	8 2	I I	+	+
	9555	ヒト	2 3	I	+	+
	10403	ヒト	3 6	I a	+	-
	10673	ヒト	8 2	I I	+	+
	14040	ヒト	8 2	I I	+	+
	14906	ヒト	8 2	I	+	+
	15151	ヒト	8 2	I	+	+
	16323	ウシ	8 2	I	+	+
	16334	ヒト	8 2	I I	+	+
	16336	ヒト	8 2	I I	+	+
	16388 (2483)	ヒト	8 2	I I	+	+
	1	NA	4	I	+	+
	2074	NA	3 6	I I	+	-

C. lari	729	NA	3 1	I	+	-
C. coli	348	NA	I 4	I	+	-
C. spuriu um subsp focalis	5754	NA	NT	NT	+	-
C. fetus subsp. fetus	7055	NA	NT	NT	+	-
C. hyoint estinali s	8494	ヒト	NT	NT	+	-
C. jejuni subsp doylei	9365	NA	NT	NT	+	-
A. butzle ri	13220	ヒト	7	I I L A	+	-
E. coli VT1+	3787 (19)	NA	NT	NT	+	-
E. coli VT2+	1119	ヒト	NT	NT	+	-

NT試験せず；NA情報無し

上記結果は、表現形発現（毒素陽性）と遺伝子型の存在（ICR陽性）により本発明のporinがC.jejuniとC.coliに保存されていることw示している。これは保存性が高くないBleser遺伝子に比べ大きな利点である。

実施例 4・

本発明によるC.jejuni2483株のPorAをH<sub>1</sub> influenzae P2とC.jejuni FlaAと比較した。作業は疎水性プロファイルとベータシート傾向をPC/Geneを利用しNovotny(3D)法により決めた。

配 列 表

(1) 一般情報:

(i) 出願人:

(A) NAME: Her Majesty the Queen in Right of Canada as  
represented by the Minister of Health and Welfare, Canada

(ii) 発明の名称: カンピロバクター・ジェジュニ由来のポリ

ン遺伝子、その関連生成物及び使用

(iii) 配列の数: 31

(v) 本出願のデータ:

出願番号: W0 PCT/CA98/

(vi) 優先権出願のデータ:

(A) 出願番号: US 60/041, 200

(B) 出願日: 1997年3月25日

(2) 配列番号: 1 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 1450塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 二本鎖

(D) トポロジ: 直鎖状

(ii) 分子型: DNA(genomic)

(iii) ハイボセテイル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(vi) 由来:

(A) 生物: *Campylobacter jejuni*

(B) 株: 2483

(xi) 配列の記載: 配列番号: 1:

CTTCGGATT TAAATTTT ACATTTTAA GTGCTTCTTA AGAAAAAACT CCMAATTTAT 60  
GTGCTACAAAT TACATGTGTT TATTAAATTTT TGCACAGGAG AATTCCTGNG AACATAGTTA 120  
AACTTAGTIT ACCTTCAGCT CTTCCTGCAG GTGCTTTTTC AGCAGCTAAC GCTACTCCAC 180  
TTGAGAAGC TATCAAGANT GTTGATGATAT CAGGTGTATT AAGATACAGA TACGATACAG 240  
GTAAATTTGA TAAAAATTC GTTAACAACAT CAAATTTTAA CACACACAAA CAGATACACA 300  
NATNAGAGC ACAAGTTNAC TTCAGTCTG CTNATGCTCA TACTTCCAAA GCTTTCATTC 360  
AGTTTGACTA CAACGCTGTT GATGGTGGCA CTGGGTGTGA TACGTNACA AATGCCGAAA 420  
AAGGACTTTT TGTTCGTCAA TTATACTTAA CTTATACAAA TGAAGATGTT GCTACAGTGT 480  
TATCCCTTGG TAAACACAA TTAAACCTTA TCTGACGGA TAAGCTTAT GATGGTTTAG 540  
TAGGACAGG TATCAAGTA GTAAACAACA GCATCGATGG TTTACTCTA GCTGCTTTTC 600  
CTGTAGTAG CTTTATGGG ONAGAGCAG GTGCAGATT ATTAGGACAA AGTACTATAT 660  
CTACACACA GAAAGAGCT CTTTTAAG TCGATTCAGT AGGAAATCTT TATGTGTGTS 720  
CTGCTGAGG TTCTTAGAT CTTCGTGGG GACAAATTTAA TCCACAAATA TCGTTAGCTT 780  
ACTGGGATCA AGTASCAATC TTCTATGCTG TAGATGCAGC TTATAGTACA ACTATCTTTG 840  
ATGGAATCAA CTGACACTT GAAGTGTCTT ACTTAGGAAA TAGCCTTGAT AGCGAACTTC 900  
ATGATAAAC ACAAGCTANT GGCATTTAT TTGCTTTNAA NGGTAGCNT GAAGTAAATG 960  
GTGGGATGC TAGCCTTGGT GCTTATNACT ACGGTGATTA AAAAAAGCT TCTACAGTCG 1020  
TATTCGAGA TCAAGTAT CTTCGTCTT TACTTGCAGG TGAAGAAAT TTCTATACTA 1080  
CTGCTTCAAG ACTAAATGGT GATACTGGTA GAATATCTT CAGTTATGTA ACTGTGAT 1140  
ATACTTTCAA CGAAGCATT CGCCTTGGTG CTGACTTCTT ATATGCTGGA AAAAAAAG 1200  
AAGATAGTC TCTGTAGCT GGTGGTAAA AACTTGAGC TGTTCGAGA GTAGATTACA 1260  
ATACTCTCC AAAAAATAC TTCTAGCNT TCTATCTCTA TGTGAACTA GATCAAGGTG 1320  
TAAACACTAA TGAAGTCT GATCATAGCA CTGTAGACT TCAGCTCTT TACAAATCTT 1380



ARGAGCTTT CAGCTTAC TTGAGCGG AGTTTGTCT CGCCTTTT TATGCTGAT 1440  
TTTTAAGACT 1450

(2) 配列番号：2 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：4247ミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：未知

(D) トポロジ：未知

(ii) 分子型：蛋白質

(v) フラグメント型：N-末端

(vi) 由来：

(A) 生物：Campylobacter jejuni

(B) 株：2483

(xi) 配列の記載：配列番号：2：

Met Lys Leu Val Lys Leu Ser Leu Val Ala Ala Leu Ala Ala Gly Ala 15  
1 5 10  
Phe Ser Ala Ala Asn Ala Thr Pro Leu Glu Glu Ala Ile Lys Asp Val 30  
20 25  
Asp Val Ser Gly Val Leu Arg Tyr Arg Tyr Asp Thr Gly Asn Phe Asp 45  
35 40  
Lys Asn Phe Val Asn Asn Ser Asn Leu Asn Asn Asn Lys Gln Asp His 60  
50 55  
Lys Tyr Arg Ala Gln Val Asn Phe Ser Ala Ala Ile Ala Asp Asn Phe 80  
65 70 75  
Lys Ala Phe Ile Gln Phe Asp Tyr Asn Ala Val Asp Gly Gly Thr Gly 95  
85 90  
Val Asp Asn Val Thr Asn Ala Glu Lys Gly Leu Phe Val Arg Gln Leu 110  
100 105

Tyr Leu Thr Tyr Thr Asn Glu Asp Val Ala Thr Ser Val Ile Ala Gly 125  
115 120  
Lys Gln Gln Leu Asn Leu Ile Trp Thr Asp Asn Ala Ile Asp Gly Leu 140  
130 135  
Val Gly Thr Gly Ile Lys Val Val Asn Asn Ser Ile Asp Gly Leu Thr 160  
145 150 155  
Leu Ala Ala Phe Ala Val Asp Ser Phe Met Ala Glu Glu Gln Gly Ala 175  
165 170  
Asp Leu Leu Gly Gln Ser Thr Ile Ser Thr Thr Thr Gln Lys Ala Ala Pro 190  
180 185  
Phe Lys Val Asp Ser Val Gly Asn Leu Tyr Gly Ala Ala Ala Val Gly 205  
195 200  
Ser Tyr Asp Leu Ala Gly Gly Gln Phe Asn Pro Gln Leu Trp Leu Ala 220  
210 215  
Tyr Trp Asp Gln Val Ala Phe Phe Tyr Ala Val Asp Ala Ala Tyr Ser 240  
225 230 235  
Thr Thr Ile Phe Asp Gly Ile Asn Trp Thr Leu Glu Gly Ala Tyr Leu 255  
245 250  
Gly Asn Ser Leu Asp Ser Glu Leu Asp Asp Lys Thr His Ala Asn Gly 270  
260 265  
Asn Leu Phe Ala Leu Lys Gly Ser Ile Glu Val Asn Gly Trp Asp Ala 285  
275 280  
Ser Leu Gly Gly Leu Tyr Tyr Gly Asp Lys Lys Ala Ser Thr Val 300  
290 295  
Val Ile Glu Asp Gln Gly Asn Leu Gly Ser Leu Leu Ala Gly Glu Glu 320  
305 310 315  
Ile Phe Tyr Thr Thr Gly Ser Arg Leu Asn Gly Asp Thr Gly Arg Asn 335  
325 330  
Ile Phe Gly Tyr Val Thr Gly Gly Tyr Thr Phe Asn Glu Thr Val Arg 350  
340 345

Val Gly Ala Asp Phe Val Tyr Gly Gly Thr Lys Thr Glu Asp Thr Ala  
355 360 365

His Val Gly Gly Lys Lys Leu Glu Ala Val Ala Arg Val Asp Tyr  
370 375 380

Lys Tyr Ser Pro Lys Leu Asn Phe Ser Ala Phe Tyr Ser Tyr Val Asn  
385 390 395 400

Leu Asp Gln Gly Val Asn Thr Asn Glu Ser Ala Asp His Ser Thr Val  
405 410 415

Arg Leu Gln Ala Leu Tyr Lys Phe

420

(2) 配列番号：3 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：1275塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：二本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子型：DNA(genomic)

(vi) 由来：

(A) 生物：Campylobacter jejuni

(B) 株：2483

(xi) 配列の記載：配列番号：3：

ATGAACTAC TTAACTTAG TTTAGTTGCA GCTCTTGCTG CAGGTGCTTT TTCAGCAGCT 60

AACCGTACTC CAGCTGAAGA AGCTATGAAA GATGTTGATG TATCAGGTGT ATTAGATAC 120

AGTTACGATA CAGGTNAATT TGATAAAAAT TTGCTTAACA ACTCAAAATT AAACACACAC 180

AAACAGATGC ACAATATAG ASCACAAAGT NACTTCAGTG CTCCTATAGC TCATTAAGTTC 240

AAAGCTTTCA TTCAGTTTGA CTACAGGCT GTTGATGGTG GCACTGGTGT TCATTAAGCTA 300

ACAAATGCGC AAAAGGAGCT TTTTGTGCGT CAATTAATCT TAACCTATTAC AAATGAAGNT 360

GTTCGTACAA GTGTATGCGC TGGTAACAAA CAATTAACCC TTATCTGGAC GGATAGCGT 420

ATTGATGGTT TAGTAGGAAC AGGTATCAAA GTAGTAACAA ACAGCATCGA TGTTTTAAGT 480

CTAGCTGCTT TTGCTGTAGA TACCTTTTAG CCGGAAAGAGC AGCTGCCAGA TTTATTAAGA 540

CAAACTACTA TATCTACAAAC ACAGAAAGCA GCTCCCTTTTA AACTGGAATC AGTAGGAANT 600

CTTTATGGTG CTGCTGCTGT AGGTTCCTTAI GATCTTGCTG CCGGACAAAT TATTCACAAA 660

TTATGGTTAG CTTACTGGGA TCAAGTAGCA TTCTTCTTAG CTGTAGATGC AGCTTATAGT 720

ACAACTATCT TTGATGGAAT CAACTGGACA CTTCAGGCTG CTTACTTAGG AAATAGCCTT 780

GATAGCGAAC TTGATGATAA AACACACGCT AATGGCAATT TATTTGCTTT AAAGGTAGC 840

ATTGAAGTAA ATGGTTGGGA TGCTAGCCCT GGTGCTTTAT ACTAGCGTGA TAAAGANAAA 900

GCTTCTACAG TCGTAATGCA AGATCAGGCT AATCTTGCTT CTTTACTTGC AGGTAGGAA 960

ATTTCTATA CTACTGGTTC AAGACTAAAT GGTGATCTG GTAGAAATAT CTTCGGTTAT 1020

GTAAGTGGTG GATATAGCTT CAAGCAACA GTTCGGCTTG GTCTGACTT CGTATATGGT 1080

GGAAACAAA CAGAGATAC TGCTCATGTA GGTGGTGCTA AAAAAGCTCA AGCTGTTGCA 1140

AGAGTAATTT ACATATCTC TCCAAAGCTT AACATCTCAG CATTCCTATC TTTATGTGAC 1200

CTAGATCAG GTGTAAACAC TAATGAAGGT GCTGATCATA GCAGCTGTAAG ACTTCAGGCT 1260

CTTTACAAAT TCTTAA 1275

(2) 配列番号：4 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：53塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子型：DNA(genomic)

(xi) 配列の記載：配列番号：4：

CTCTCCCTTC TCGAATCGTA ACCGTTCTGTA CGAAGATCGC TCTCTCTCC TTC

(2) 配列番号：5 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：57塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子型：DNA(genomic)

(xi) 配列の記載：配列番号：5：

GATCGAAGGA GAGGACGCTG TCTGTGGAAG GTTAGGAAAG GAGGAGAA GGGGAG 57

(2) 配列番号：6 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：57塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子型：DNA(genomic)

(xi) 配列の記載：配列番号：6：

AATTCGAGA GAGGACGCTG TCTGTGGAAG GTTAGGAAAG GAGGAGAA GGGGAG 57

(2) 配列番号：7 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：57塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子型：DNA(genomic)

(xi) 配列の記載：配列番号：7：

AGCTGAAGA GAGGACGCTG TCTGTGGAAG GTTAGGAAAG GAGGAGAA GGGGAG

(2) 配列番号：8 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：57塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子型：DNA(genomic)

(xi) 配列の記載：配列番号：8：

CTAGGAAGA GAGGACGCTG TCTGTGGAAG GTTAGGAAAG GAGGAGAA GGGGAG 57

(2) 配列番号：9 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：30塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子型：DNA(genomic)

(xi) 配列の記載：配列番号：9：

CGAATCGTAA CCGTTGCTAC GCAATCGCT 30

(2) 配列番号：10 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：20塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子型：DNA(genomic)

(xi) 配列の記載：配列番号：10：

GGTAATTTTG AATAAATTT

20

(2) 配列番号：11の情報：

(i) 配列の特徴：

- (A) 長さ：20塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 分子型：DNA(genomic)
- (xi) 配列の記載：配列番号：11；

GATCAGGTA AATTGATTA

20

(2) 配列番号：12の情報：

(i) 配列の特徴：

- (A) 長さ：20塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 分子型：DNA(genomic)
- (xi) 配列の記載：配列番号：12；

GAGGAGGTA TCAGAGATG

20

(2) 配列番号：13の情報：

(i) 配列の特徴：

- (A) 長さ：20塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 分子型：DNA(genomic)
- (xi) 配列の記載：配列番号：13；

TCCACCATC AACGCGTTC

20

(2) 配列番号：14の情報：

(i) 配列の特徴：

- (A) 長さ：20塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 分子型：DNA(genomic)
- (xi) 配列の記載：配列番号：14；

TNAGTAGCA CTTCAAGTG

20

(2) 配列番号：15の情報：

(i) 配列の特徴：

- (A) 長さ：20塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 分子型：DNA(genomic)
- (xi) 配列の記載：配列番号：15；

ACTTGCTC TATATTGTC

20

(2) 配列番号：16の情報：

(i) 配列の特徴：

- (A) 長さ：20塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 分子型：DNA(genomic)
- (xi) 配列の記載：配列番号：16；

TCGATACGAA CTTGATGATA

20

(2) 配列番号：17の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：20塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子型：DNA(genomic)

(xi) 配列の記載：配列番号：17：

AGCTCCGAA CCGTTACTT

20

(2) 配列番号：18の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：20塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子型：DNA(genomic)

(xi) 配列の記載：配列番号：18：

TGACTTCGTA TATGTCGAA

20

(2) 配列番号：19の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：20塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子型：DNA(genomic)

(xi) 配列の記載：配列番号：19：

CTCCGAATTT ATGTGCTACA

20

(2) 配列番号：20の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：20塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子型：DNA(genomic)

(xi) 配列の記載：配列番号：20：

CTATCGAATTT TCGACTTCT

20

(2) 配列番号：21の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：20塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子型：DNA(genomic)

(xi) 配列の記載：配列番号：21：

TGAAGATGTT GCTACAAATG

20

(2) 配列番号：22の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：20塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子型：DNA(genomic)

(xi) 配列の記載：配列番号：22：

CTACTCTGC AACAGCTTCA

20

(2) 配列番号：23の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：20塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子型：DNA(genomic)

(xi) 配列の記載：配列番号：23：

CTTCAAGCT TTGTTTCAGT

20

(2) 配列番号：24の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：20塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子型：DNA(genomic)

(xi) 配列の記載：配列番号：24：

GAAGAGTCCG TGGATTACG

20

(2) 配列番号：25の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：20塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子型：DNA(genomic)

(xi) 配列の記載：配列番号：25：

ASCGATCGAG CTATTATTAA

20

(2) 配列番号：26の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：20塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子型：DNA(genomic)

(xi) 配列の記載：配列番号：26：

TTTACGACAC CCGGCGAGT

20

(2) 配列番号：27の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：20塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子型：DNA(genomic)

(xi) 配列の記載：配列番号：27：

GCTCTGGAG CATCTGTGT

20

(2) 配列番号：28の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：18塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子型：DNA(genomic)

(xi) 配列の記載：配列番号：28：

ACTTACGGGGA GACCAATGA

18

(2) 配列番号: 29の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 28塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子型: DNA(genomic)

(xi) 配列の記載: 配列番号: 29:

ATTATGCGCTT AGAGTCTTTT TGGAAATCC

28

(2) 配列番号: 30の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 20塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子型: DNA(genomic)

(xi) 配列の記載: 配列番号: 30:

GGTTCTCTTA CCACCAATGC

20

(2) 配列番号: 31の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 20塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子型: DNA(genomic)

(xi) 配列の記載: 配列番号: 31:

TGCTACGGCTT GTTCAACATG

20

参考文献

1. Adhya, S., and m. Gotteman. 1978. Control of transcription termination. Ann. Rev. Biochem. 47:967-996.
2. Austen, E., and O. Westwood. 1991. Bacterial protein translocation. In Protein targeting and secretion. D. Rickwood, editor. IRL Press, Oxford, UK. p. 13-23.
3. Bolla, J., E. Loret, M. Zalewski, and J. Pages. 1995. Conformational analysis of the *Campylobacter jejuni* porin. J. Bacteriol. 177:4266-4271.
4. Burucoa, C., C. Frenaux, Z. Pei, M. Tummuru, M. Blaser, Y. Cenatiempo, and J. Fauchere. 1995. Nucleotide sequence and characterization of *peb4A* encoding an antigenic protein in *Campylobacter jejuni*. Res. Microbiol. 146:467-476.
5. Calva, E., J. Torres, M. Vazquez, V. Angeles, H. de la Vega, and G. Ruiz-Palacios. 1989. *Campylobacter jejuni* chromosomal sequences that hybridize to *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* LT enterotoxin genes. Gene. 75:243-251.
6. Chakrabarti, S., K. Chaudhuri, K. Sen, and J. Das. 1996. Porins of *Vibrio cholerae*: Purification and characterization of OmpU. J. Bacteriol. 178:524-530.

7. Chan, V.L., H. Bingham, A. Kibue, P.R.V. Nayudu and J.L. Penner. 1988. Cloning and expression of the *Campylobacter jejuni* *glpA* gene in *Escherichia coli*. *Gene*. 73:185-191.

8. DE Martino, L., C. Nazzaro, S. Concilio, and M. Galdiero. 1995. Morphological changes induced in HEP-2 cells by *Salmonella typhimurium* porins. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 27:445-449.

9. Doig, P., M. Exner, R. Hancock, and T. Trust. 1995. Isolation and characterization of a conserved porin protein from *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* 177:5447-5452.

10. Exner, M., P. Doig, T. Trust, and R. Hancock. 1995. Isolation and characterization of a family of porin proteins from *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 63:1567-1572.

11. Fauchere, J.-L., M. Kervella, A. Rosenau, J. pages, and C. Fendri. 1992. In vitro study of virulence factors of enteric *Campylobacter* spp. In: *Campylobacter jejuni: Current Status and Future Trends*. I. Nachamkin, M. Blaser and L. Tompkins, eds. ASM, Washington, DC. pg. 168.

12. Garnier, J., D. Osguthorpe, and B. Robson. 1978. Analysis of the accuracy and implications of simple method for predicting the secondary structure of globular proteins. *J. Mol. Biol.* 120:97-120.

13. Gonzales, C., A. Isibasi, V. Ortiz-Navarrete, J. Paniagua, J. Garcia, F. Blanco, and J. Kumate. lymphocyte proliferative response to outer membrane proteins isolated from *Salmonella*. *Microbiol. Immunol.* 37:793-799.

14. Gotschlich, E., M. Seiff, M. Blake, and M. Koomcy. 1987. Porin protein of *Neisseria gonorrhoeae*: Cloning and gene structure. *Pro. Natl. Acad. Sci.* 84:8135-8139.

15. Guerry, P., R. Alm, M. Power, and T. Trust. Molecular and structural analysis of *Campylobacter* flagellin. p. 267-281. In I. Nachamkin, M. Blaser, and L. Tompkins (ed.), *Campylobacter jejuni: Current Status and Future Trends*, ASM, Washington DC.

16. Hansen, E., F. Gonzales, N. Chamberlain, M. Norgard, E. Miller, L. Cope, S. Peizel, R. Gaddy, A. Clausell. 1988. Cloning and the gene encoding the major outer membrane protein of *Haemophilus influenzae* type b. *Infect. Immun.* 56:2709-2716.

17. Hansen, E., C. Hasemann, A. Clausell, J. Capra, K. Orth, C. Moomaw, C. Slaughter, J. Latimer, and E. Miller. 1989. Primary structure of the porin protein of *Haemophilus influenzae* type b determined by nucleotide sequence analysis. *Infect. Immun.* 57:1100-1107.

18. Huyer, M., T. Parr, R. Hancock, and W. Page. 1986. Outer membrane protein of *Campylobacter jejuni*. *FEMS Microbiol. Lett.* 37:247-250.



19. Johnson, W., and H. Lior. 1988. A new heat-labile cytolethal-distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* sp. Microb. Pathog. 4:115-126.
20. Kennell, W., and S. Holt. 1991. Extraction, purification and characterization of major outer membrane proteins from *Wolinella recta* ATCC 33238. 59:3740-3749.
21. Kervella, M., J.-L. Fauchere, D. Fourel, and J.-M. Pagis. 1992. Immunological cross-reactivity between outer membrane pore proteins of *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli*. FEMS microbiology letters. 99:281-286.
22. Louie, H., and V. Chan. 1993. Cloning and characterization of the gamma-glutamyl phosphate reductase gene of *Campylobacter jejuni*. Mol. Gen. Genet. 240:29-35.
23. Mahajan, S., and F. G. Rodgers. 1989. Virulence of *Campylobacter jejuni* for chicken embryos. J. Clin. Microbiol. 27:1377-1379.
24. Mahajan, S., and F. G. Rodgers. 1990. Isolation, characterization, and host cell-binding properties of a cytotoxin from *Campylobacter jejuni*. J. Clin. Microbiol. 28:1314-1320.
25. Marmur, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. J. Mol. Biol. 3:208-218.

26. Mizuno, K., K. Takama, and S. Suzuki. 1994. Characteristics of cytotoxin produced by *Campylobacter jejuni* strains. Microbios. 78: 215-228.
27. Morva, N., K. Nakamura, and M. Inouye. 1980. Gene structure of the OmpA protein, major surface protein of *Escherichia coli* required for cell-cell interaction. J. Mol. Biol. 143:317-328.
28. Nachamkin, I. 1995. *Campylobacter* and *Arcobacter*. In Manual of Clinical Microbiology. P. Murray, E. Baron, M. Pfaller, F. Tenover, and R. Tenover, eds. ASM Press, Washington, DC. Pg. 483-491.
29. Nakaido, H. 1992. Pores and specific channels of bacterial outer membranes. Mol. Microbiol. 6:435-442.
30. Newell, D., and I. Nachamkin. 1992. Immune response directed against *Campylobacter jejuni*. In *Campylobacter jejuni: Current status and Future Trends*. I. Nachamkin, M. Blaser, and L. Tompkins, editors. ASM, Washington, DC. 201-206.
31. Novotny, J., and C. Auffray. 1984. Nucl. Acids. Res. 12:243-255.
32. O'Brien, A., J. Newland, S. Miller, R. Holmes, H. Smith, and S. Formal. 1984. Shiga-like toxin-converting phage from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. Science. 226:694-696.

33. Pesci, E., D. Cottle, and C. Pickett. 1994. Genetic, enzymatic, and pathogenic studies of the iron superoxide dismutase of *Campylobacter jejuni*. Infect. Immun. 62:2687-2694.
34. Pickett, C., E. Pesci, D. Cottle, G. Russell, A. Erdem, and H. Zeytin. 1996. Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* sp. *cdtB* genes. Infect. Immun. 64:2070-2078.
35. Popot, J., C. De Vtry, and A. Attella. 1994. Folding and assembly of integral membrane proteins: an introduction. In Membrane protein and structure: Experimental approaches. S. White, ed. Oxford University Press, New York. pg. 41-96.
36. Qi, H., J. Tai, and M. Blake. 1994. Expression of large amounts of Neisserial porin proteins in *Escherichia coli* and refolding of the proteins into native trimers. Infect. Immun. 62:2432-2439.
37. Riley, J., R. Butler, D. Ogilvie, R. Finnleear, D. Jenner, S. Powell, R. Anand, J. Smith, and A. Markham. 1990. A novel, rapid method for the isolation of terminal sequences from yeast artificial chromosomal (YAC) clones. Nucl. Acids Res. 18:2887-2890.
38. Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

39. Skirrow, M. and M. Blaser. 1992. Clinical and epidemiologic considerations, p.3-8. In I. Nachamkin, M. Blaser, and L. Tompkins (ed.), *Campylobacter jejuni: Current Status and Future Trends*, ASM, Washington DC.
40. Suzuki, S., M. Kawaguchi, K. Mizuno, K. Takama, and N. Yuki. 1994. Immunological properties and ganglioside recognitions by *Campylobacter jejuni*-enterotoxin and cholera toxin. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 8:207-211.
41. Tauxe, R. 1992. Epidemiology of *Campylobacter* infections in the United States and other industrialized nations. In: *Campylobacter jejuni: Current Status and Future Trends*. I. Nachamkin, M. Blaser and L. Tompkins, eds. ASM, Washington, DC. pg. 9.
42. Taylor, D. 1992. Genetics of *Campylobacter* and *Helicobacter*. Annu. Rev. microbiol. 46:35-64.
43. Taylor, D., M. Eaton, W. Yan, and N. Chang. 1992. Genome maps of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. J. Bacteriol. 174:2332-2337.
44. Tenover, F., C. Fennell, L. Lee, and D. Leblanc. 1992. Characterization of two plasmids from *Campylobacter jejuni* isolates that carry the *aphA-7* kanamycin resistance determinant. Antimicrob. Agents. Chemother. 36:712-716.

45. Tommassen, J., M. Agterberg, R. Jansen, and G. Spierings. 1993. Use of the enterobacterial outer membrane protein PhoE in the development of new vaccines and DNA probes. *Int. J. Med. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis.* 278:396-406.
46. Welte, W., U. Nestel, T. Wacker, and K. Diederichs. 1995. Structure and function of the porin channel. *Kid. Intern.* 48:930-940.
47. Skirrow, M. and Blaser, M. Clinical and epidemiologic considerations. In: *Campylobacter jejuni: Current Status and Future Trends*, edited by Nachamkin, I., Blaser, M. and Tompkins, L. Washington DC: ASM, 1992, p. 3-8.
48. Tauxe, R. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. In: *Campylobacter jejuni: Current Status and Future Trends*, edited by Nachamkin, I., Blaser, M. and Tompkins, L. Washington DC: ASM, 1992, p. 9-19.
49. McSweeney, E. and Walker, R. Identification and characterization of two *Campylobacter jejuni* adhesions for cellular and mucus substrates. *Am.J.Epidemiol.* 1986; 53:141-148.
50. Sears, C. And Kaper, J. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol. Rev.* 1996; 60: 167-215.
51. Wassenaar, T. Toxin production by *Campylobacter* spp. *Clin.Microbiol.Rev.* 1997; 10:466-476.

52. Kawaguchi, M., Takama, K. and Suzuki, S. Distribution and solubilization of *Campylobacter jejuni* toxins. *Microbios Letters* 1989; 42:113-118.
53. Suzuki, S., Kawaguchi, M., Mizuno, K., Takama, K. and Yuki, N. Immunological properties and ganglioside recognitions by *Campylobacter jejuni*-enterotoxin and cholera toxin. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* 1994; 6:207-212.
54. Johnson, W. and Lior, H. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CDT) produced by *Campylobacter* spp. *Micro.Pathog.* 1988; 4:115-126.
55. Pickett, C., Pesci, E., Cottle, D., Russell, G., Erdem, A. and Zeytin, H. Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* sp. cdtB genes. *Infect.Immun.* 1996; 64:2070-2078.
56. Mahajan, S. and Rodgers, F.G. Virulence of *Campylobacter jejuni* for chicken embryos. *J.Clin.Microbiol.* 1989; 27:1377-1379.
57. Mahajan, S. and Rodgers, F.G. Isolation, Characterization, and Host-cell-binding properties of a cytotoxin from *Campylobacter jejuni*. *J.Clin.Microbiol.* 1990; 28:1314-1320.
58. Guerrant, R., Wanke, C., Pennie, R., Harrell, L., Lima, A. and O'Brien, A. Production of a unique cytotoxin by *Campylobacter jejuni*. *Infect.Immun.* 1987; 55:2526-2530.

59. Johnson, W. and Lior, H. Cytotoxic and cytotoxic factors produced by *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter lariidis*. *J.Clin.Microbiol.* 1986; 24:275-281.
60. Mizuno, K., Takama, K. and Suzuki, S. Characteristics of cytotoxin produced by *Campylobacter jejuni* strains. *Microbios* 1994; 78:215-228.
61. Welte, W., Nestel, U., Wacker, T. and Diederichs, K. Structure and function of the porin channel. *Kid.Intern.* 1995; 48:930-940.
62. Movva, R., Nakamura, K. and Inouye, M. Gene structure of the ompA protein, a major surface protein of *Escherichia coli* required for cell-cell interaction. *J.Mol.Biol.* 1980; 143:317-328.
63. Nikaido, H. Porins and specific channels of bacterial outer membranes. *Mol.Microbiol.* 1992; 6:435-442.
64. Somnese, L., Donnarumma, G., Cipollaro de L'ero, G., Marcatali, A., Vitiello, M. and Galdiero, M. Growth hormone modulates IL- $\alpha$  and INF- $\gamma$  release by murine splenocytes activated by LPS or porins of *Salmonella typhimurium*. *J.Med.Microbiol.* 1996; 45:40-47.
65. Galdiero, F., Cipollaro de L'ero, G., Donnarumma, G. and Marcatali, A. Interleukin-1 and interleukin-6 gene expression in human monocytes stimulated with *Salmonella typhimurium* porins. *Immunology.* 1995; 86:612-619.

66. Gonzales, C., Isibasi, A., Ortiz-Navarrete, V., Paniagua, J., Garcia, J., Blanco, F., and Kumate, J. Lymphocytic proliferative response to outer-membrane proteins isolated from *Salmonella*. *Microbiol.Immunol.* 1993; 37:793-799.
67. Kervella, M., Fauchère, J-L., Fourel, D. and Pagès, J-M. Immunological cross-reactivity between outer membrane pore proteins of *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol.Lett.* 1992; 99:281-286.
68. Bolla, J-M., Loret, E., Zaleski, M. and Pagès, J-M. Conformational analysis of the *Campylobacter jejuni* porin. *J.Bacteriol.* 1995; 177:4266-4271.
69. Huyer, M., Parr, T., Hancock, R. and Page, W. Outer membrane protein of *Campylobacter jejuni*. *FEMS Microbiol.Lett.* 1986; 37:247-250.
70. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1992. Ed. 2
71. Pollard, D., Johnson, W., Lior, H., Tyler, S. and Rozee, K. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J.Clin.Microbiol.* 1990; 28:540-545.
72. Xiang, Z., Censini, S., Bayell, P., Telford, J., Figura, N., Rappuoli, R., and Covacci, A. Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveal that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression

of the vacuolating cytotoxin. *Infect.Immun.* 1995; 63:94-98.

73. Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P. and Smith, F. Colorimetric method for detection of sugars and related substances. *Anal.Chem* 1956; 28:350-356.

74. Segrest, J. and Jackson, R. Molecular weight determination of glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate. In: *Methods of Enzymology*, edited by Ginsburg, V. New York: Academic Press, 1972, p. 54-63.

75. Kennell, W. and Holt, S. Extraction, purification and characterization of major outer membrane proteins from *Wolinsella recta* ATCC 33230. *Infect.Immun.* 1991; 59:3740-3749.

76. Yeen, W., Puthucheary, S. and Pang, T. Demonstration of a cytotoxin from *Campylobacter jejuni*. *J.Clin.Pathol.* 1983; 36:1237-1240.

77. Moore, M., Blaser, M., Perez-Perez, G. and O'Brien, A. Production of a Shiga-like cytotoxin by *Campylobacter*. *Microb.Pathog.* 1988; 4:455-462.

78. Misawa, N., Ohnishi, T., Itoh, K. and Takahashi, E. Development of a tissue culture assay system for *Campylobacter jejuni* cytotoxin and the influence of culture conditions on cytotoxin production. *J.Med.Microbiol.* 1994; 41:224-230.

79. Fauchere, J., Kervella, M., Rosenau, A., Pagès, J-M. and Fendi, C. In vitro study of virulence factors of enteric *Campylobacter* spp. In: *Campylobacter jejuni: Current Status and Future Trends*, edited by Nachamkin, I., Blaser, M. and Tompkins, L. Washington DC: ASM, 1992, p. 168-175.

80. Wecl, J., van der Hulst, R., Gerrits, Y., Roorda P., Feller M., Dankert J., Tytgat G., and van der Ende, A. The interrelationship between cytotoxin-associated gene A, vacuolating cytotoxin, and *Helicobacter pylori*-related diseases. *J.Infect.Dis.* 1996; 173:1171-1175.

81. Inward, C., Williams, J., Chant, I., Crocker, J., Milford, D., Rose, P., and Taylor, C. Verocytotoxin 1 induces apoptosis in Vero cells. *J.Infect.* 1995; 30:213-218.

82. Chen, Y. and Zychlinsky, A. Apoptosis induced by bacterial pathogens. *Microb.Pathog.* 1994; 17:203-212.

83. De Martino, L., Nazzaro, C. and Galdiero, M. Morphological changes induced in HEP-2 cells by *Salmonella typhimurium* porins. *J.Submicrosc.Cytol.Pathol.* 1995; 27:445-449.

84. Bjerknes, R., Guttormsen, H., Solberg, C. and Wetzier, L. Neisserial porins inhibit human neutrophil actin polymerization, degranulation, opsonin receptor expression, and phagocytosis but prime the neutrophils to increase their oxidative burst. *Infect.Immun.* 1995; 63:160-167.

85. Galdiero, F., Tufano, M., Galdiero, M., Masiello, S. and Di Rosa, M. Inflammatory effects of *Salmonella* typhimurium porins. *Infect.Immun.* 1990; 58:3183-3186.
86. Galdiero, F., Cipollaro de L'ero, G., Benedetto, N., Galdiero, M. and Tufano, M. Release of cytokines induced by *Salmonella typhimurium* porins. *Infect.Immun.* 1993; 61:155-161.
87. Misawa, N., Ohnishi, T., Itoh, K. and Takahashi, E. Cytotoxin detection in *Campylobacter jejuni* strains of human and animal origin with three tissue culture assay systems. *J. Med. Microbiol.* 1995; 43: 354-359.
88. Menzl, K., Maier, E., Chakraborty, T. and Benz, R. HlyA hemolysin of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor: identification of the hemolytic complex and evidence for the formation of anion-selective ion-permeable channels. *Eur.J.Biochem.* 1996; 240:646-654.
89. Luzzi, I., Covacci, A., Censini, S., Pezzella, C., Crotti, D., Facchini, M., Giammanco, A., Guglielmetti, P., Piersimoni, C., Bonamico, M., Mariani, P., Rappuoli, R., and Caprioli, A. Detection of a vacuolating cytotoxin in stools from children with diarrhea. *Clin.Infect.Dis.* 1996; 23:101-106.
90. Penner, J. and Aspinall, G. Diversity of lipopolysaccharide structures in *Campylobacter jejuni*. *J. Infect. Dis.* 1997; 176 (Suppl 2): S135-138.

91. Allos, B.M. Association between *Campylobacter* infection and Guillain-Barré syndrome. *J. Infect. Dis.* 1997; 176 (Suppl 2): S125-128.

【図1】

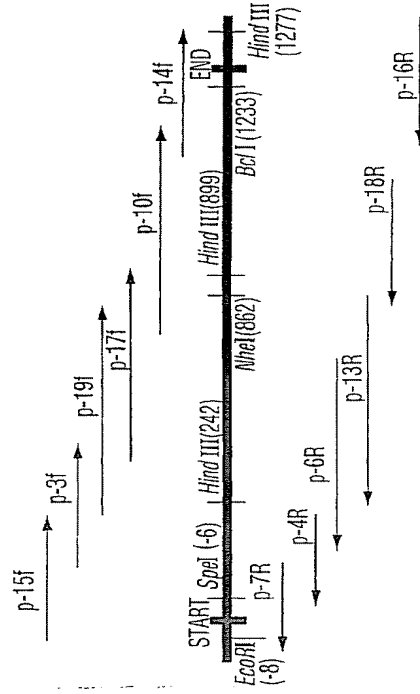


FIG. 1

【図2】

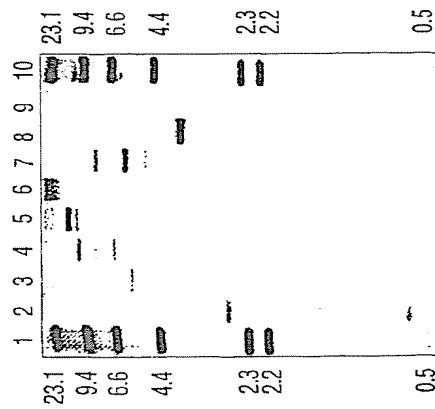


FIG. 2

【図3】

CCTTCGGATTAAATTTTCTTACCTTTTAAAGTCTCTTAAAGAAAGAACTCCCAATTTAT 60  
-35  
-10

61 CTGCTACATTCACATGTTTATTAATTTTTCACAAAGAGAAATTCCTCAAGAACTAGTTTA 120  
RBS M K L V K 5

121 AACTTACTTTTACTTGCAGCTCTGCTCCAGCTGCTTTTTCAGCAGCTACCTGCTAC 180  
L S L V A A L A A G A F S A A N A T P L 25

181 TTGAAGAAGCTATCAAGATGTTGATGATCAGGTGTTATTAAGATACAGTACGTAACG 240  
E E A I X D V D V S G V L R Y R Y D T G 45

241 GTAAATTTGATTAATAATTTGTTAACACTCAATTTTAACACACACAAACAGATCACA 300  
N F D K N F V N N S L N N N K O D H K 65

301 AATATGAGCAGCTTACTTCAAGTCTGCTATAGCTGATTAACCTTCAAGCTTTTCAATC 360  
Y R A Q V N F S A A I A D N F K A F I Q 85

361 AGTTTACTACAGCTGTTGATGTTGTCGCTGCTGTTGTAACGTAAACAAATGCCGAAA 420  
F D Y N A V D G G T G V D N V T N A E K 105

421 AAGACTTTTGTTCGTAATTAATTAATTAACAAATGAAGATGTTGCTCAAGTC 480  
G L F V R Q L Y L T Y T N E D V A T S V 125

481 TAATCGTGGTAAACAAATTAACCTTATCTGGACGATACGCTATTGATGCTTTAG 540  
I A G K Q Q L N L I W T D N A I D G L V 145

541 TAGGACAGGTATCAAGTAGTAACACACAGATCGATGTTTAACTCTAGCTGCTTTTG 600  
G T G I K V V N N S I D G L T L A A F A 165

601 CTGTAGTAGCTTTATGGCGAAGACAGCTGCAGATTTATTAAGACAAAGTACTATAT 660  
V D S F M A E E O G A D L L G Q S T I S 185

661 CTACACACAGAAAGCAGCTCCTTTTAAAGTGGATTCAGTACGAAATCTTTATGCTGCTG 720  
T T Q K A A P F K V D S V G N L Y G A 205

721 CTGCTGATGTTCTTATGATCTTCTGGCGACAAATTTAAATCCACAAATTTATGTTAGCTT 780  
A V G S Y D L A G G Q F N P Q L W L A Y 225

781 ACTGGATCAAGTAGCAATCTTCTATGCTGATGATGACCTTATAGTACAACTATCTTTG 840  
W D Q V A F F Y A V D A A Y S T I F D 245

841 ATGGATCACTGGACACTTGAAGTGTCTTACTTGAAGAAATAGCCTTGTATAGCACTTG 900  
G I N W T L E G A Y L G N S L D S E L D 265

901 ATGNTAAACACACGCTAAAGGCAATTTATTTGCTTTTAAAGAGTACATTCAGTAAATG 960  
D K T H A N G N L F A L K G S I E V N G 285

961 GTTGGATGCTAGCCTTGGTGGTTTATCTAGCGTGTATAGAAAGCTTCTACAGTCG 1020  
W D A S L G G L Y Y G D K E K A S T V V 305

1021 TAATCGAAGTCAAGGTAACTTTGTTCTTACTTTCAGGTTGAGGAAATTTTCATACTTA 1080  
I E D Q G N L G S L L A G E E I F Y T T 325

FIG. 3





【図6】



FIG. 6A

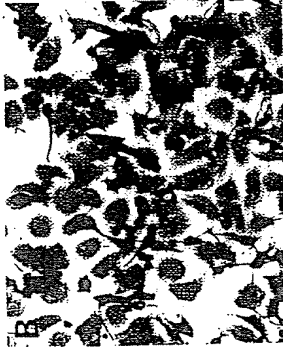


FIG. 6B

【図6】



FIG. 6C

【図4】

351  
C. jejuni PORA  
H. influenzae P2  
E. cloacae PhOE  
K. pneumoniae PhOE  
S. typhi OmpC  
E. coli PhOE  
401  
C. jejuni PORA  
H. influenzae P2  
E. cloacae PhOE  
K. pneumoniae PhOE  
S. typhi OmpC  
E. coli PhOE  
414  
C. jejuni PORA  
H. influenzae P2  
E. cloacae PhOE  
K. pneumoniae PhOE  
S. typhi OmpC  
E. coli PhOE

FIG. 4 (cont'd)

【図5】

FIG. 5  
T  
T T  
T G  
G:C  
A:T  
1410 - G:C - 1420  
G:C  
C:G  
G:C  
G:C  
1405 - A:T - 1425  
A:T  
GTCTAACTTC TTTTATGCC

【図7】

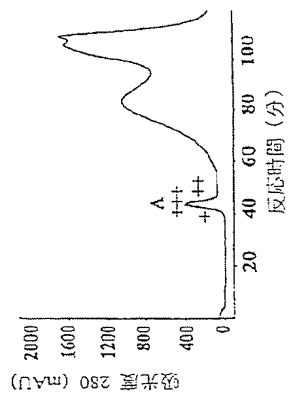


FIG. 7A

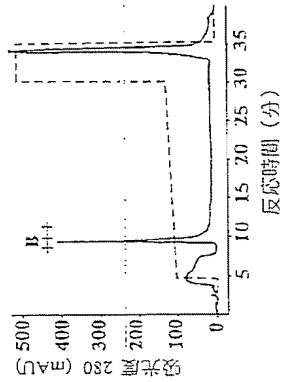


FIG. 7B

【図8】

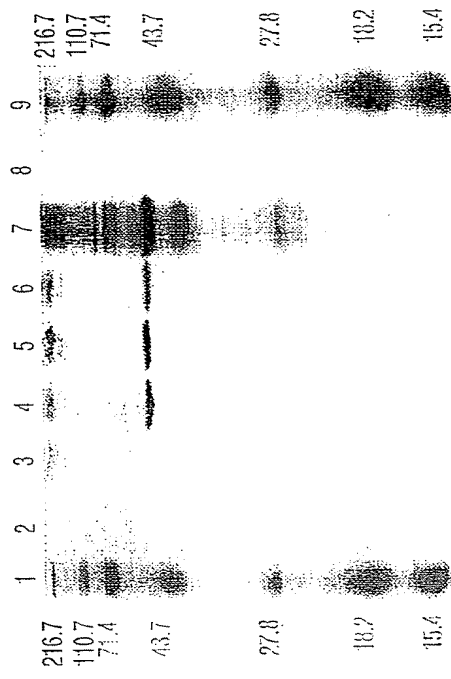


FIG. 8

【図9】

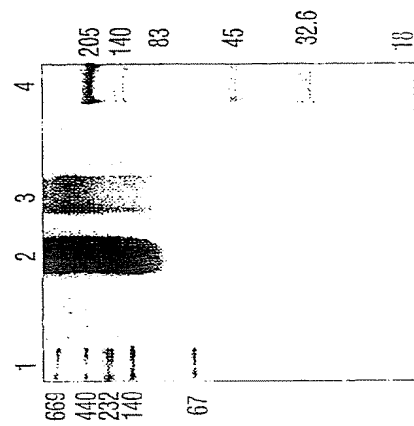


FIG. 9

【図10】

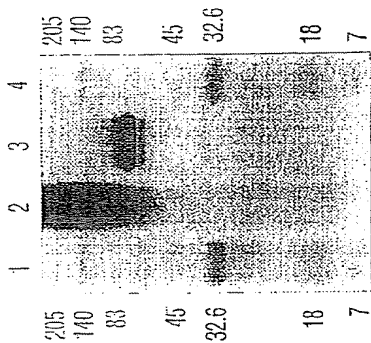


FIG. 10

【図11】

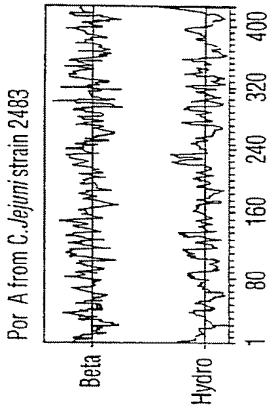


FIG. 11A

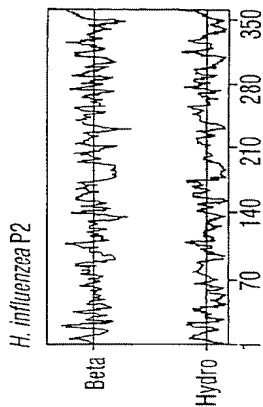


FIG. 11B

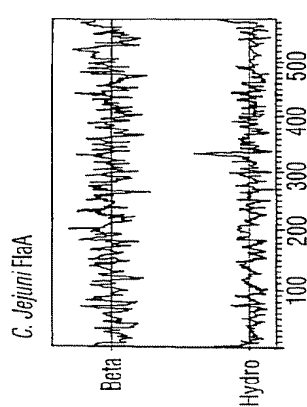


FIG. 11C



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

C (Continuing documents considered to be relevant)		International Application No. PCT/CA 98/00272
Category	Claims or Abstract, with necessary drawings, if the drawing is part of the application	Relevant date No.
P, X	WOSEK I ET AL: "Campylobacter jejuni major outer membrane protein and a 59-kDa protein are involved in binding to fibronectin and INT 407 cell membranes." FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, vol. 157, 1997, pages 233-238, XP002071491 see the whole document	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/CA 98/00272	
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 172(a) for the following reasons: 1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos. 21 and 22 because they relate to subject matter not required to be searched by the Authority, namely: Remark: Although claim(s) 21 and 22 is(are) directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition. 2. <input type="checkbox"/> Claims Nos. because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements with respect to certain formal requirements of the International Search Report. 3. <input type="checkbox"/> Claims Nos. because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
The International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: 1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims. 2. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims. 3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid specifically claims Nos. 21 and 22. 4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is omitted by claims Nos. 21 and 22. Remark on Protest <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	識別記号	F I	特コード (参考)
C 1 2 N	1/19 1/21 5/10	C 1 2 N 1/21 C 1 2 Q 1/68 G 0 1 N 33/53	A D F
C 1 2 Q	1/68	33/569	
G 0 1 N	33/53	C 0 7 K 16/12	C
// C 0 7 K	16/12	C 1 2 P 21/02	
C 1 2 P	21/02	21/08	Z N A A
	21/08	5/00	A
(81)指定国	EP(A,T, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L, U, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, M W, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, E S, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, M G, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, V N, YU, ZW		
(72)発明者	ベーゴン, デビッド ジェイ. アメリカ合衆国, メリーランド 20906, シルバースプリングス, ウィスバリング ハイムズ ドライヴ 320L, アバートメ ント 12		
(72)発明者	ロジャース, フランク アメリカ合衆国, ニューハンプシャー 03820, ドーバー, プラウニング ドライ ヴ 9		
(72)発明者	ボウ, ジャン-ミッシェル フランス国, エフ-13009 マルセイユ, リュ ラビュタン シャンタル, 30		